

UNIVERSITETET FOR MILJØ- OG BIOVITENSKAP



## Forord

Denne oppgaven er levert som avsluttende masteroppgave i utdannelsen innen matvitenskap – mat og helse, Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (IKBM) ved Universitetet for miljø og biovitenskap (UMB), Ås.

Oppgaven ble utført ved Nofima AS i perioden august 2011 til mai 2012, og har vært en del av et større forskningsprosjekt, NFR prosjektet ”Det Sunne Måltid” (202379/I0).

Jeg vil først og fremst rette en stor takk til veilederen min på Nofima, Grethe Iren Borge. Hun har vært til stor hjelp under hele prosessen og en god støttespiller under selve oppgaveskrivingen.

Videre vil jeg gi en stor takk til Kristi Ekrann Aarak for å ha hjulpet meg gjennom hele oppgavens forløp. Hun har bidratt mye gjennom arbeidet på laboratoriet og med bearbeiding av resultater.

Jeg vil også få takke Gjermund Vogt for hans gode hjelp til tolkning av resultater og til å stille opp når det er spørsmål på laboratoriet.

I tillegg må jeg få takke Elin Merete Nicolaisen og Frank Lundby for god hjelp og veiledning på laboratoriet, Bente Kirkhus og Stefan Sahlstrøm for gode innspill og hjelp gjennom hele året.

Til slutt, men ikke minst må jeg få takke Gerd Vegarud, min hovedveileder på UMB.

Ås, 15. mai 2012

---

Lydia Lineikro

## Sammendrag

Formålet med dette studiet var å studere påvirkningen av plantematerialer og rene plantestoffer på fordøyelsesenzymet pankreatisk lipase. Pankreatisk lipase er nøkkelenzym for hydrolyse av triglyserider til monoglyserid og frie fettsyrer som kan absorberes i tarmen. Inhibering eller forsinkelse av fetthydrolysen kan resultere i redusert fettopptak og medføre at ufordøyd fett når nedre del av tynntarmen og dermed gir økt metthetssignalisering og vektkontroll. En modell for *in vitro* fordøyelse av fett, med hovedfokus på pankreatisk lipase ble derfor opparbeidet. Et kolorimetrisk lipase assay viste seg å ikke være egnet til formålet, og en tidligere etablert modell for hydrolyse av proteiner og stivelse (Aura, A.-M., *et al.*, 1999) ble videreutviklet og optimalisert med tanke på type lipid og mengde substrat, volum, galledalter, pH, inkubasjonstid og andre komponenter som må være tilstede for å oppnå tilnærmede fysiologiske forhold.

Plantematerialer og rene plantestoffers inhibering av lipaseaktiviteten ble bestemt ved å fraksjonere ulike lipidklasser ved bruk av fast fase ekstraksjon (SPE) og bestemme frigjøringen av frie fettsyrer ved bruk av gasskromatografi (GC). Plantematerialene som ble studert var brokkoliknopper, bygg og solbær. Resultatene viste at byggekstrakt og solbærpressrestkonsentrat inhiberte lipaseaktiviteten, mens brokkoliknopper viste ingen inhibering av lipaseaktiviteten. Noen rene plantestoffer ble testet ut, hhv de tre fenoliske syrene, kaffesyre, ferulsyre og sinapinsyre, og flavonolet quercetin. Kaffesyre og ferulsyre ga redusert lipaseaktivitet ved 5  $\mu$ M, men lavere reduksjon ved høyere konsentrasjoner. Sinapinsyre og quercetin viste derimot ingen inhibering av lipaseaktiviteten.

## Abstract

The purpose of this study was to analyze the effects of different plant materials and pure plant substances on the digestive enzyme pancreatic lipase. Pancreatic lipase is the key enzyme for the hydrolysis of triglycerides to monoglycerides and free fatty acids that can be absorbed in the intestine. Inhibition of fat hydrolysis may result in reduced fat absorption, and the presence of undigested lipids in the lower part of the small intestine may stimulate satiety and weight control. In order to study how plant materials influence fat hydrolysis, a model for *in vitro* digestion of fat, with a focus on pancreatic lipase, was developed. A commonly used colorimetric lipase assay was shown not to be suitable for this purpose and a previously established model for hydrolyses of proteins and starch (Aura, A.-M., *et al.*, 1999) was chosen for further development. The model was optimized in terms of type and amount of lipid substrate, volume, bile salts, pH, incubation time and other components that must be present to achieve *in vivo* physiological conditions.

The inhibition of lipase activity by plant materials and pure plant substances was determined by fractionation of various lipid classes using solid phase extraction (SPE) and determination of the release of free fatty acids by gas chromatography (GC). The plant materials studied were broccoli flower buds, barley and black currant. Barley extract and black currant press-residue concentrate appeared to inhibit the lipase activity, whereas broccoli flower buds did not show any inhibitory effect. The pure plant substances investigated were the three phenolic acids, caffeic acid, ferulic acid and sinapic acid and the flavonol quercetin. Caffeic and ferulic acid showed reduced lipase activity at 5  $\mu\text{M}$ , but lower reduction at higher concentrations. Sinapic acid and quercetin showed no inhibition of the lipase activity.

## Innholdsfortegnelse

|   |      |
|---|------|
| Forord .....  | i    |
| Sammendrag .....  | ii   |
| Abstract .....  | iii  |
| Innholdsfortegnelse .....   | iv   |
| Oversikt over figurer og tabeller .....                               | vi   |
| Forkortelser .....  | viii |
| 1 Introduksjon .....  | 1    |
| 1.1 Innledning .....  | 1    |
| 1.2 Fordøyelsessystemet .....   | 3    |
| 1.2.1 Munn .....  | 3    |
| 1.2.2 Mage .....  | 4    |
| 1.2.3 Tynntarm .....  | 5    |
| 1.2.4 Tykktarm .....  | 6    |
| 1.3 Fettfordøyelse .....  | 6    |
| 1.4 <i>In vitro</i> fordøyelsesmodeller .....                         | 9    |
| 1.4.1 <i>In vitro</i> fettfordøyelse .....                            | 10   |
| 1.5 Polyfenoler .....   | 12   |
| 1.5.1 Fenoliske syrer .....   | 13   |
| 1.5.2 Flavonoider .....   | 14   |
| 1.5.3 Polyfenoler i maten og deres biotilgjengelighet .....           | 15   |
| 1.6 Inhibitoriske effekter på pankreatisk lipase .....                | 17   |
| 1.6.1 Planteekstrakter og polyfenoler .....                           | 17   |
| 1.6.2 Orlistat som lipasehemmer .....                                 | 18   |
| 1.7 Brokkoli ( <i>Brassica oleracea</i> L. var <i>italica</i> ) ..... | 20   |
| 1.8 Bygg ( <i>Hordeum vulgare</i> ) .....                             | 21   |
| 1.9 Solbær ( <i>Ribes nigrum</i> L.) .....                            | 22   |
| 1.10 Prinsipper for målemetoder .....                                 | 24   |
| 1.10.1 Kolorimetrisk analyse .....                                    | 24   |
| 1.10.2 Fastfase ekstraksjon (SPE) .....                               | 24   |
| 1.10.3 Flammeionisasjonsdetektor (FID) .....                          | 28   |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 2     | Formålet med studien .....  | 30 |
| 3     | Materialer og metoder .....   | 31 |
| 3.1   | Prøveopparbeidelse og prøvemateriale.....   | 32 |
| 3.1.1 | Brokkoli og brokkoliknopper .....   | 32 |
| 3.1.2 | Bygg .....  | 34 |
| 3.1.3 | Ekstraksjon av bygg .....   | 35 |
| 3.1.4 | Solbærpressrest.....  | 35 |
| 3.1.5 | Fenoliske syrer .....   | 36 |
| 3.1.6 | Flavonoler.....   | 36 |
| 3.2   | Uttesting og modifisering av metoder for bestemmelse av pankreatisk lipase aktivitet          | 37 |
| 3.2.1 | Kolorimetrisk <i>in vitro</i> assay for bestemmelse av lipaseaktivitet.....                   | 37 |
| 3.2.2 | <i>In vitro</i> lipid fordøyelse med kommersielt pankreatisk lipase enzym .....               | 38 |
| 3.2.3 | <i>In vitro</i> fordøyelse av fett/olje med pankreatisk lipase .....                          | 42 |
| 3.3   | Tilsetning av ulike matkomponenter for å undersøke deres påvirkning på lipaseaktiviteten..... | 45 |
| 4     | Resultat.....   | 48 |
| 4.1   | Uttesting og modifisering av metoder for bestemmelse av pankreatisk lipase aktivitet          | 48 |
| 4.1.1 | Kolorimetrisk <i>in vitro</i> assay for bestemmelse av lipaseaktivitet.....                   | 48 |
| 4.1.2 | Modifisering og optimalisering av Aura-modellen.....  | 49 |
| 4.2   | Inhibitoriske effekter på pankreatisk lipase.....   | 50 |
| 4.2.1 | Orlistat som lipasehemmer .....   | 50 |
| 4.2.2 | Plantematerialer som lipasehemmere .....  | 51 |
| 4.2.3 | Rene plantestoffer som lipasehemmere.....   | 56 |
| 5     | Diskusjon.....  | 62 |
| 5.1   | Uttesting og modifisering av metoder for bestemmelse av pankreatisk lipase aktivitet.         | 62 |
| 5.2   | Inhibitoriske effekter på pankreatisk lipase .....  | 66 |
| 5.2.1 | Statistiske analyser .....  | 70 |
| 5.3   | Videre arbeid .....   | 70 |
| 6     | Konklusjon .....  | 71 |
| 7     | Kilder.....   | 72 |

## Oversikt over figurer og tabeller

|  |    |
|--|----|
| Figur 1.1: Oversiktsbilde over fordøyelseskanalen.....   | 3  |
| Figur 1.2: Oversiktsbilde over tynntarmen .....  | 5  |
| Figur 1.3: Oversiktsbilde over pankreas (bukspyttkjertelene), galleblæra og deres forbindelse med duodenum .....   | 7  |
| Figur 1.4: Gallesalt med hydrofil ( $OR_2$ ) og hydrofob ( $COOR_1$ ) ende. ....   | 7  |
| Figur 1.5: Micelledannelse.....  | 8  |
| Figur 1.6: Pankreatisk lipase kutter i triglyseridets posisjon en og tre, og det dannes to frie fettsyrer og ett monoglyserid.....   | 9  |
| Figur 1.7: Kjemisk struktur av f.v. hydroksybenzosyre og hydroksykanelsyre.....  | 13 |
| Figur 1.8: Kjemisk struktur av f.v. ferulsyre, kaffesyre og sinapinsyre.....   | 13 |
| Figur 1.9: Kjemisk struktur av f.v. flavonoler og flavonolet quercetin.....  | 14 |
| Figur 1.10: Inhibering av pankreatisk lipase med kanelsyre og hydroksykanelsyre derivater  | 18 |
| Figur 1.11: Kjemisk struktur av lipase inhibitoren Orlistat .....  | 19 |
| Figur 1.12: Høsteklar brokkoli .....   | 20 |
| Figur 1.13: F.v. ulike typer byggkorn. Ulike typer foredlet byggkorn .....   | 22 |
| Figur 1.14: Prinsippene for fastfase ekstraksjon .....   | 25 |
| Figur 1.15: Instrumentet Gerstel MultiPurpose Sampler MPS 2XL Twister – automatisert fast fase ekstraksjon .....   | 27 |
| Figur 1.16: Skjematisk presentasjon av en gasskromatograf .....  | 27 |
| Figur 1.17: Kromatogram som viser separasjon av fettsyrer .....  | 29 |
| Figur 3.1: Flytskjema for prøveopparbeidelse, uttesting og modifisering av metoder, og hvordan de til slutt slås sammen for in vitro å bestemme pankreatisk lipase aktivitet ..... | 31 |
| Figur 3.2: Brokkoliknopper.....  | 32 |
| Figur 3.3: Fryst brokkoliekstrakt.....   | 34 |
| Figur 3.4: Hel og malt byggryn.....  | 34 |
| Figur 3.5: Fryst solbærpressrestkonsentrat.....  | 35 |
| Figur 3.6: Fasedannelse vist etter sentrifugering .....  | 43 |
| Figur 4.1: Lipaseaktivitet målt kolorimetrisk ved ulike fortynninger av pankreatin og galle i tre analysegentak (1-3).....   | 48 |
| Figur 4.2: Effekt av Orlistat på pankreatisk lipase.....   | 51 |

|  |    |
|--|----|
| Figur 4.3: Inhibering av pankreatisk lipase med frysetørket brokkoliknopper .....  | 52 |
| Figur 4.4: Effekt av brokkoliekstrakt på pankreatisk lipase.....   | 53 |
| Figur 4.5: Effekt av byggekstrakt på pankreatisk lipase. Verdiene er gitt som<br>gjennomsnittsverdier av to gjentak med $\pm$ standard avvik .....   | 54 |
| Figur 4.6: Inhibering av pankreatisk lipase med byggekstrakt, gitt som prosent. Verdiene er<br>gitt som gjennomsnittsverdier av to gjentak med $\pm$ standard avvik .....  | 54 |
| Figur 4.7: Inhibering av pankreatisk lipase med byggekstrakt, korrigert for % inhibering av<br>benyttede volum 20 % metanol. Verdiene er gitt som gjennomsnittsverdier av to gjentak med<br>$\pm$ standard avvik ..... | 55 |
| Figur 4.8: Effekt av solbærpressrestkonsentrat på pankreatisk lipase. Tallene er gitt som<br>gjennomsnittsverdier av tre gjentak med $\pm$ standard avvik .....  | 55 |
| Figur 4.9: Inhibering av pankreatisk lipase med solbærpressrestkonsentrat, oppgitt i prosent.<br>Tallene er gitt som gjennomsnittsverdier av tre gjentak med $\pm$ standard avvik.....                                 | 56 |
| Figur 4.10: Effekt av kaffesyre på pankreatisk lipase .....  | 57 |
| Figur 4.11: Effekt av ferulsyre på pankreatisk lipase. Resultatene er gitt som<br>gjennomsnittsverdier av to gjentak med $\pm$ standard avvik .....  | 58 |
| Figur 4.12: Inhibering av pankreatisk lipase med kaffesyre og ferulsyre, oppgitt i prosent....   | 59 |
| Figur 4.13: Effekt av sinapinsyre på pankreatisk lipase.....   | 59 |
| Figur 4.14: Effekt av quercetin (løst i 100 % metanol) på pankreatisk lipase .....   | 60 |
| Figur 4.15: Effekt av quercetin (løst i 20 % metanol) på pankreatisk lipase .....  | 61 |
| <br>   |    |
| Tabell 3.1: Sammensetningen av galle, natriumbikarbonat, natriumklorid, vann og pankreatisk<br>lipase (pankreatin) i <i>in vitro</i> assayet med et totalvolum på 8,1 mL .....   | 41 |
| Tabell 3.2: Konsentrasjon av tilsatte mengder plantematerialer til <i>in vitro</i> fordøyelse .....  | 45 |
| Tabell 3.3: Konsentrasjon av tilsatte mengder rene plantestoffer til <i>in vitro</i> fordøyelse .....  | 46 |



## **Forkortelser**

|      |  |
|------|--|
| FAME | Fettsyremetylestere                            |
| FFA  | Frie fettsyrer                                 |
| SPE  | Fast fase ekstraksjon – solid phase extraction |
| FID  | Flammeionisasjonsdetektor                      |
| GC   | Gasskromatografi                               |
| PBS  | Fosfatbufret salin                             |

# 1 Introduksjon

## 1.1 Innledning

På grunn av stadig økende helseproblemer knyttet til fedme og utvikling av metabolsk syndrom, har det blitt et enormt fokus på et sunnere kosthold og fysisk aktivitet for å forebygge dette. Epidemiologiske studier har vist at inntak av fiberrike kornprodukter, grønnsaker, frukt og bær kan gi nedsatt risiko for utvikling av livsstilssykdommer. Forskning har fått frem kunnskap om hva som påvirker kroppen gjennom maten vi spiser, men fortsatt er mye ukjent, spesielt hva som påvirker matens innholdsstoffer gjennom fordøyelsen og hvordan funksjoner i mage-tarm systemet kan knyttes til utvikling av livsstilssykdommer.

Forskning har vist at enkelte plantematvarer, spesielt bær, med høyt innhold av enkelte polyfenoler, kan påvirke enzymer i fordøyelsessystemet. Dette danner grunnlaget for denne masteroppgaven, som har hatt som målsetning å undersøke om ulike plantematerialer og rene plantestoffer kan ha hemmende effekt på pankreatisk lipase (triacylglycerol acyl hydrolase), et av nøkkelenzymene i fettfordøyelsen. Ved å hemme fettfordøyelsen vil man kunne få redusert absorpsjon av fett i tynntarmen. Det vil også kunne stimulere metthetssignaler og dermed gi økt vektkontroll.

Opgaven har vært tilknyttet et pågående prosjekt finansiert av Norges Forskningsråd, ”Det Sunne Måltid” (202379/I0), som koordineres av Nofima, og utføres i samarbeid med Universitetet for miljø og biovitenskap (UMB) og Nasjonalt institutt for ernærings- og sjømatforskning (NIFES). Forskningsfokuset i prosjektet er på måltidet som helhet og samspillet mellom ulike bestanddeler i et ”modell”-måltid sammensatt av laks, byggris og brokkoli, samt melk. I dette prosjektet studeres effekter av prosessering, *in vitro* fordøyelse (mage og tynntarm) og fermentering (tykktarm) på bioaktive forbindelser i brokkoli, bygg, laks og melk. Prosjektet omfatter også cellekultur-studier og fôringsforsøk med en musemodell.

Denne oppgaven er knyttet til prosjektets studier på *in vitro* fordøyelse av brokkoli og bygg, mens en annen masterstudent, Silje Johansen, har jobbet med prosessering og kjemiske

## INTRODUKSJON

analyser av brokkoli og bygg. Det har vært et samarbeid om enkelte av de kjemiske analysene.

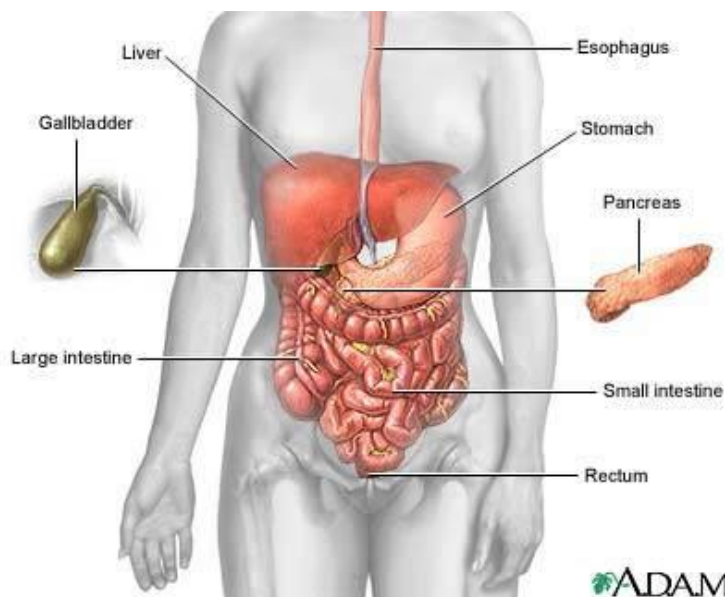
For å kartlegge innholdet av spesifikke bioaktive forbindelser, med fokus på polyfenoler, i prøvematerialene, ble første del av oppgaveforløpet benyttet til å opparbeide kunnskap om innhold av totale fenoler og antioksidantkapasitet i bygg. Dette ble utført i samarbeid med mastergradsstudent Silje Johansen, der hun videre utførte mer spesifikke kjemiske analyser av brokkoli for å bestemme innholdet av ulike flavonoler, noe som har vært av interesse for denne oppgaven. Henviser dermed til hennes oppgave for resultater og metoder.

Fokuset i denne oppgaven har vært å studere effekter av utvalgte brokkoli- og byggprøver (brokkoliknopper og byggryn), men også en bærprøve (solbærpressrestkonsentrat) på *in vitro* fettfordøyelse. Etter å ha bestemt hvilke polyfenoler som prøvene var rike på, ble det valgt ut noen fenoliske syrer og flavonoler som er kommersielt tilgjengelige, for å undersøke effekten av disse på pankreatisk lipase. For å kunne studere *in vitro* fettfordøyelse må man benytte en *in vitro* simulering av fordøyelsen i duodenum. I tynntarmens øvre del av duodenum finnes pankreatisk lipase, saltsyre, natriumbikarbonat og gallesalter. For å lage en *in vitro* fordøyelsesmodell for studier av pankreatisk lipaseaktivitet mest mulig lik de fysiologiske forholdene *in vivo* må mengder pankreatisk lipase, saltsyre, natriumbikarbonat og gallesalter optimaliseres i forhold til mengde fett (substrat) i måltidet. Modellen kan benyttes til å studere effekten av ulike mengder plantematerialer og rene plantestoffer på pankreatisk lipasen.

En del av oppgaven har i samarbeid med doktorgradsstipendiat Kristi Ekrann Aarak vært å etablere en *in vitro* fordøyelsesmodell av duodenum med fokus på enzymet pankreatisk lipase ved å modifisere og optimalisere en allerede publisert *in vitro* modell (Aura, A.-M., *et al.*, 1999). Modellen, som senere i oppgaven vil benevnes som Aura-modellen, simulerer fordøyelsessystemet fra munn til ileum (tynntarmens siste del) basert på enzymatisk hydrolyse av fordøyelig stivelse og proteiner. Modellen ble i denne oppgaven videre modifisert og optimalisert med fokus på pankreatisk lipase aktivitet.

## 1.2 Fordøyelsessystemet

Menneskers fordøyelsessystem består av munnen, spiserøret, magen, tynn- og tykktarmen, rektum og anus (se figur 1.1). Under fordøyelsen brytes maten ned både mekanisk og kjemisk slik at næringen fra maten kan absorberes av kroppen. Human fordøyelsesjuice inneholder enzymer som kjemisk bryter ned proteiner, karbohydrater og fett, mens peristaltiske muskelsammentrekninger fører maten gjennom fordøyelsessystemet ved å ”kverne” og bryte ned maten slik at næringen frigjøres og kan absorberes (Saladin, K.S., 2010, McClements, D. J. *et al.*, 2010). pH i de ulike delene av fordøyelsen varierer mye og har en stor innvirkning på aktiviteten av fordøyelsesenzymene (Saladin, K.S., 2010).



**Figur 1.1:** Oversiktsbilde over fordøyelseskanalen (ADAM)

### 1.2.1 Munn

Fordøyelsen starter i munnen hvor maten blir tygd og på den måten brutt ned til mindre biter. Spytt som produseres har en pH på 5,5 til 6,1 under faste og rundt pH 7 til 8 etter inntak av mat (McClements, D. J. *et al.*, 2010). Spyttet inneholder blant annet enzymene  $\alpha$ -amylase og lingual lipase. Ved en slik nøytral pH er  $\alpha$ -amylase aktiv og starter nedbrytningen av stivelse i maten, mens lingual lipase, som starter nedbrytningen av fett, først aktiveres når maten svelges og når magens sure miljø. Etter hvert som maten beveger seg til spiserøret, strekkes spiserøret ut og trigger peristaltiske sammentrekninger som dytter maten foran seg ned i magen. (Saladin, K.S., 2010)

### 1.2.2 Mage

Magen er den delen av fordøyelseskanalen hvor maten blir prosessert og lagret før den blir ført videre til tynntarmen hvor de fleste næringsstoffene absorberes (McClements, D. J. *et al.*, 2010). pH i magen ligger mellom 1 og 3 i fastende tilstand, men pH vil øke til mellom 4,5 og 5,8 etter matinntak, etterfulgt av en gradvis reduksjon til pH 2 (Dressman, J.B., *et al.*, 2007, McClements, D. J. *et al.*, 2010). Den høye surhetsgraden i magen har en rekke fysiologiske roller som inkluderer aktivering av enzymer, hydrolyse av ulike matkomponenter og inaktivering av mikroorganismer.

I magen blandes maten med magesaft, som i all hovedsak består av vann, saltsyre og fordøyelseenzymer, hovedsakelig pepsin i form av pepsinogen og gastrisk lipase (Saladin, K.S., 2010, Aura, A.-M., 2005). Daglig gastrisk sekresjon vil være ca. 1500 mL (Aura, A. - M., 2005). Saltsyren har flere funksjoner, deriblant aktivering av pepsinogen og lingual lipase, og nedbrytning av bindevev og planters cellevegger for å myke opp maten og danne kymus<sup>1</sup> (Saladin, K.S., 2010). Pepsinogen aktiveres i kontakt med saltsyre og transformeres til pepsin, en aktiv protease (Aura, A.-M., 2005). Pepsin har som hovedoppgave å bryte ned proteiner i maten til kortere peptidkjeder som kan passere videre til tynntarmen hvor fordøyelsen vil bli fullført. Gastrisk lipase fortsetter fettfordøyelsen sammen med lingual lipase (Saladin, K.S., 2010).

Magen foretar en rekke peristaltiske sammentrekninger som fører til videre nedbrytning av maten, og frigjørelse av kymus inn i tynntarmen i små mengder. Sammentrekningene varierer i frekvens og varighet ettersom magen er fylt med mat eller ikke. En matkomponent kan være i magen alt i fra få minutter til timer helt avhengig av dens energiinnhold, struktur og plassering. Maksimal størrelse på partiklene som kan overføres inn i tynntarmen via pylorus som er lukkemuskelen mellom mage og tarm, er én til to millimeter store (McClements, D. J. *et al.*, 2010).

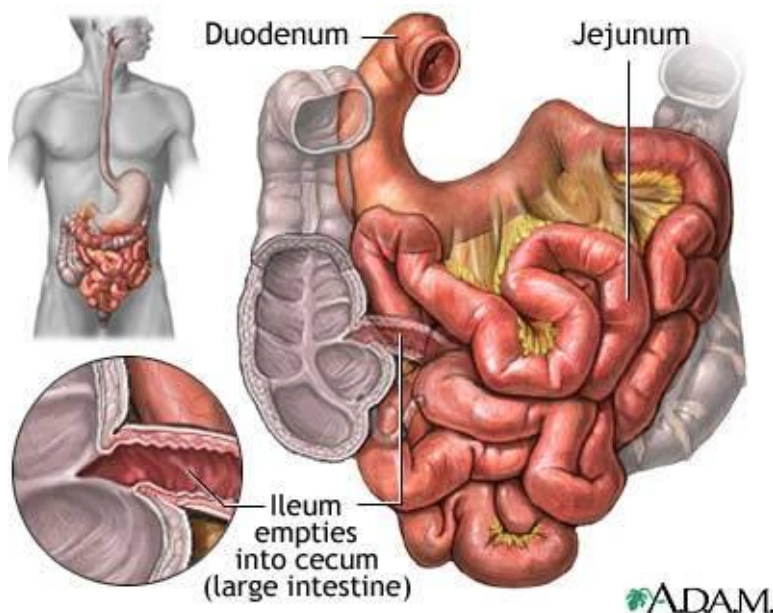
---

<sup>1</sup> Kymus: En masse av delvis ufordøyd mat

### 1.2.3 Tynntarm

I tynntarmen fordøyes maten videre og næringsstoffer absorberes. Tynntarmen består av tre deler, duodenum, jejunum og ileum (se figur 1.2). Etter at kymus kommer inn i duodenum blandes den med natriumbikarbonat, gallesalter, fosfolipider og enzymer sekretert fra leveren, pankreas (bukspyttkjertelen) og galleblæra. Pankreas sekreterer natriumbikarbonat som har en nøytraliserende effekt på magesyren, slik at pH endres fra 1-3 i magen til pH 5,8-6,5 i duodenum (Saladin, K.S., 2010). Både galle og natriumbikarbonat sekreteres fra leveren og lagres i galleblæra. Daglig sekresjon av galle og bukspytt vil være opp mot 2000 mL (Pedersen, J.I., *et al.*, 2009).

Ved nøytral pH virker de pankreatiske enzymene mest effektivt. De pankreatiske enzymene er pankreatisk  $\alpha$ -amylase som fordøyer stivelse, trypsin og chymotrypsin som fordøyer proteiner, karboksypeptidase som fjerner aminosyrer fra karboksylenden (-COOH-enden) hos små peptider, ribonuklease og deoksyribonuklease som fordøyer RNA og DNA og pankreatisk lipase som fordøyer fett. Pankreatisk lipase har som oppgave å bryte ned fett, dvs. triglyserider, til frie fettsyrer og monoglyserid. Daglig pankreatisk sekresjonsvolum vil være ca. 1000 mL (Saladin, K.S., 2010).



**Figur 1.2:** Oversiktsbilde over tynntarmen (ADAM)

### 1.2.4 Tykktarm

Materialet som ikke absorberes i tynntarmen passerer videre inn i tykktarmen. Tykktarmen deles inn i cøkum, ascending colon, transverse colon, descending colon, sigmoid og rektum. På grunn av tynntarmens aktive absorpsjon vil kun ca. 1500 mL kymus fraktes fra ileum inn i cøkum daglig (Aura, A. -M., 2005). Hovedoppgaven til tykktarmen er å absorbere vann og elektrolytter, fermentere polysakkarider og proteiner, re-absorbere gallesalter slik at de sendes tilbake til leveren for å kunne benyttes på nytt, og dannelse, lagring og til slutt frigjørelse av feces. pH i tykktarmen varierer, med lavere pH i deler hvor fibre blir fermentert av bakterier og kortkjedede fettsyrer blir frigjort. pH har blitt observert til å ligge rundt 5,5-6,8 ulike steder i tykktarmen (McClements, D. J. *et al.*, 2010).

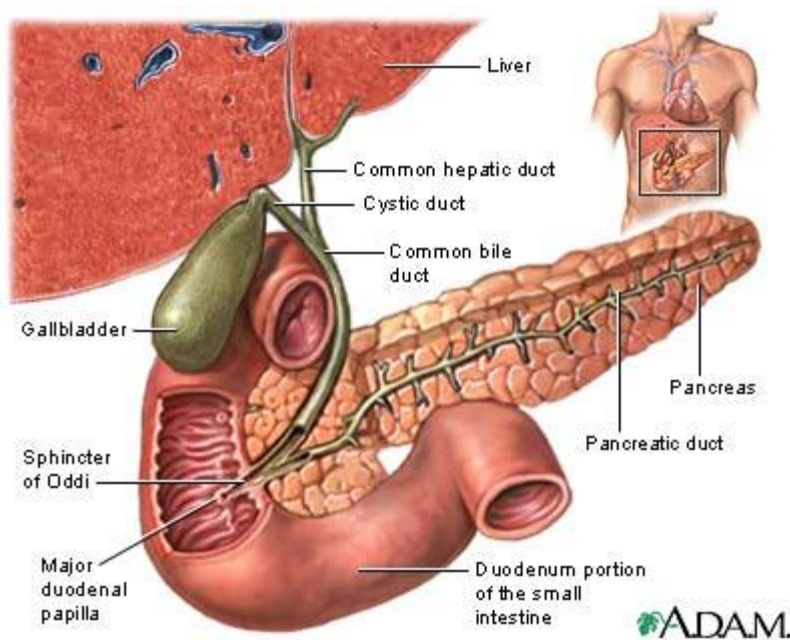
### 1.3 Fettfordøyelse

Fett består av triglyserider, som er hydrofobe og uløselig i vann, og har dermed et annet fordøyesforløp enn proteiner og karbohydrater (Saladin, K.S., 2010). Fordøyelsen av fett starter i munnen hvor maten blandes med lingual lipase som aktiveres når pH synker i magesekken. Sammen med gastrisk lipase, som utskilles i magen, står de to enzymene for 10-15 % av fettfordøyelsen.

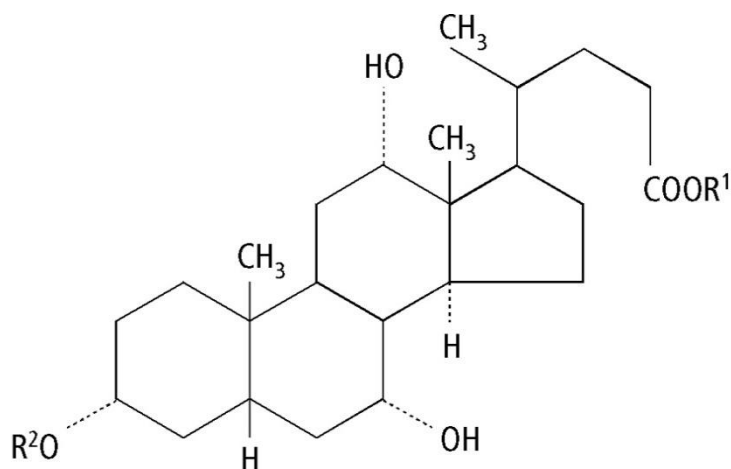
Når kymus går ned i duodenum er fett i store globuler<sup>2</sup>. For at pankreatisk lipase skal aktiveres er enzymet avhengig av gallesalter og fosfolipider (se figur 1.3) som virker som emulgatorer og bryter ned globulene i mindre fettdråper. Gallesaltene syntetiseres fra kolesterol i leveren og er amfipatiske med en hydrofil side og en hydrofob side (se figur 1.4). Gallesaltenes struktur danner grunnlaget for at de kan interagere med ikke-polare stoffer, for eksempel lipider, med den hydrofobe siden, samtidig som den hydrofile siden kan reagere med polare stoffer, for eksempel vann. I fastende tilstand er innholdet gallesalter i duodenum mellom 1,4 og 6,4 mM, mens etter tilførsel av mat ligger den rundt 5 til 15 mM (McClements, D. J. *et al.*, 2010).

---

<sup>2</sup> Globuler: Store separate fettpartikler



**Figur 1.3:** Oversiktsbilde over pankreas (bukspyttkjertelene), galleblæra og deres forbindelse med duodenum (ADAM)



**Figur 1.4:** Gallesalt med hydrofil ( $OR_2$ ) og hydrofob ( $COOR_1$ ) ende (Salter, J. *et al.*, 1996).

$R^1$  = taurin, glysin eller hydrogen

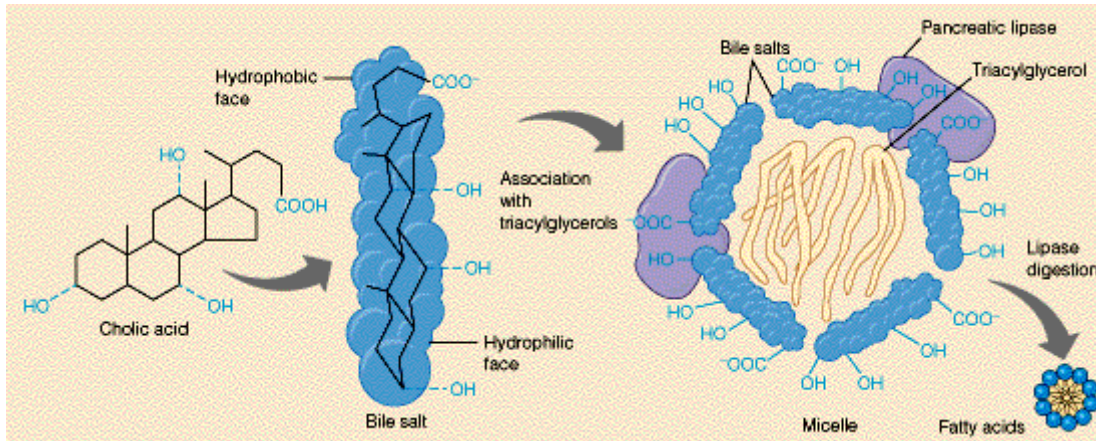
$R^2$  = svovelsyre, glukuronsyre eller hydrogen

For at fett skal kunne absorberes i tarmen må det brytes ned til monoglyserid og frie fettsyrer. Gallesaltenes hydrofobe ende fester seg til triglyseridene og danner sammen med fosfolipider såkalte miceller (se figur 1.5). Miceller dannes av 20 til 40 slike komplekser med den

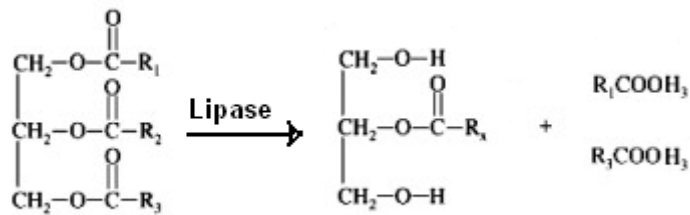


## INTRODUKSJON

hydrofile ende pekende utover og den hydrofobe pekende innover. Micellene er vannløselige og negativt ladde ved at de polare gruppene vender ut i vannfasen (Mathews, C. K., *et al.*, 2000, Saladin, K.S., 2010). For at pankreatisk lipase skal binde seg til fettene, er lipasen avhengig av gallesalter, kalsium, ko-enzymet ko-lipase og optimal pH. pH-optimum for pankreatisk lipase er pH 8,5, men enzymet fungerer også godt ved nøytral pH (pH 7). (McClements, D. J. *et al.*, 2010). Ko-lipase syntetiseres fra leveren som prolipase og aktiveres av trypsin som kutter prolipasen i begge ender. Ko-lipase og lipase danner et kompleks, hvor bindingen mellom dem er både elektrostatiske og hydrofob (Erlanson-Albertson, C., *et al.*, 1983). Den elektrostatiske bindingen er mellom Glu<sub>15</sub> på ko-lipase (Erlanson, C., *et al.*, 1977) og lysin i lipasen (Erlanson, C., 1977). Styrken på den elektrostatiske bindingen vil være sterkt påvirket av type lipid som finnes i løsningen. Noen lipider vil øke bindingstyrken opptil hundre ganger. Ko-lipase vil i nærvær av gallesalter binde seg til triglyseridet og aktivere pankreatisk lipase, slik at lipasen får fri tilgang til hydrolyse av fettene (Erlanson-Albertson, C., *et al.*, 1983, Saladin, K.S., 2010). Lipasen hydrolyserer esterbindingene i første og tredje posisjon i triglyseridene. Sluttproduktet vil være to frie fettsyrer og ett monoglyserid (se figur 1.6) (Saladin, K.S., 2010).



**Figur 1.5:** Micelledannelse (Mathews, C.K., *et al.*, 2000)



**Figur 1.6:** Pankreatisk lipase kutter i triglyseridets posisjon en og tre, og det dannes to frie fettsyrer og ett monoglyserid

For at fett skal bli absorbert i tarmen er det avhengig av dannelse av ørsmå miceller (ca 5 nm). Disse består av frie fettsyrer, monoglyserider, kolesterol og fettløselige vitaminer som frigjøres i epitelcellene. Inne i cellene transporteres de frie fettsyrene og monoglyseridet til endoplasmatisk retikulum hvor de resyntetiseres tilbake til triglyserider. Triglyseridene omdannes og pakkes sammen med kolesterol og proteiner til kylomikroner. Kylomikronene skilles ut fra tarmcellene og over i lymfeårene i tarmtottene til venene nær hjertet før de fraktes ut i blodet (Saladin, K.S., 2010).

Normalt vil fett være fullstendig fordøyd før det når tykktarmen, men noen ufordøyde lipider vil kunne passere gjennom fordøyelseskanalen uten å bli brutt ned. Hvis lipiddråper er ”omringet” av et ufordøyelig lag eller innebygd i en ufordøyelig matriks (f eks. fibre), kan noen lipider forlate tynntarmen ikke fullstendig fordøyd. Noen av lipidene kan bli videre fordøyd i tykktarmen på grunn av bakteriefermenteringen som foregår der (McClements, D. J. *et al.*, 2010). Noen lipider blir aldri ferdigfordøyd og skilles ut i feces.

## 1.4 *In vitro* fordøyelsesmodeller

En rekke *in vitro* fordøyelsesmodeller (Hur, S. J., *et al.*, 2011, Boisen, S., *et al.*, 1991, Aura, A.-M., *et al.*, 1999) har gjennom tidene blitt utviklet for å kunne studere og forstå fordøyelsen *in vivo*. Ulike fordøyelsesmodeller, som simulerer ett eller flere trinn av fordøyelsen, oppnår ofte de fysiologiske forholdene på ulike måter. I praksis vil det allikevel ikke være mulig å lage en *in vitro* modell som eksakt simulerer fordøyelsen *in vivo*. Til det er en *in vivo* fordøyelse for kompleks (Hur, S. J., *et al.*, 2011). Fordøyelsen varierer mye mellom individer, og kan påvirkes av faktorer som alder, kjønn, helse, mental tilstand og tid på dagen. Det er et

## INTRODUKSJON

stort antall ulike faktorer som mengde, komposisjon, partikkelstørrelse, inhiberende faktorer, gallesekresjon og enzymaktivitet, som spiller inn på matens fordøyelse (McClements, D. J., *et al.*, 2008). Ikke minst er fordøyelsen en dynamisk prosess som er vanskelig å etterlikne i *in vitro* modeller.

En *in vitro* fordøyelsesmodell kan som sagt simulere én eller flere deler av fordøyelsessystemet. En fordøyelsesmodell basert på én del av fordøyelsessystemet, og ett enzyms aktivitet, kan være nyttige for å kartlegge fordøyeligheten av ett enkelt næringsstoff. En slik enkel modell (metode) er ofte fordelaktig fordi den muliggjør en standardisering av *in vitro* fordøyelsesmodeller, noe som fører til mer reproducerbare resultater og gjør det enklere å sammenlikne mellom laboratorier (Coles, L. T., *et al.*, 2005). Da fordøyelsen av et næringsstoff ofte påvirkes av fordøyelsen av et annet, vil slike enkle systemer være langt fra fysiologisk relevante. Det vil ofte være mer realistisk å benytte en kompleks blanding av ulike enzymer. De fleste *in vitro* modellene består derfor ofte av to- (mage og tynntarm) eller tre-stegs prosedyrer (munn, mage og tynntarm, eller mage, tynntarm og tykktarm) (Boisen, S., *et al.*, 1991).

En modell basert på én del av fordøyelsessystemet, og kun ett fordøyelsesenzym vil kunne være fordelaktig for å kunne studere ett enkelt enzyms aktivitet, sammen med ulike andre faktorer. Disse faktorene må bli tatt med i betraktningene siden aktiviteten til enzymet ofte er påvirket av eller er avhengig av andre komponenter som må være tilstede for at enzymet skal aktiveres og fungere optimalt.

### **1.4.1 *In vitro* fettfordøyelse**

*In vitro* modeller for studier av fettfordøyelse kan fokusere på én del av fordøyelsen, og studere aktiviteten av ett enkelt enzym, lipase, eller det kan benyttes en rekke sekvensielle trinn for å simulere hele fordøyelsesprosessen (Boisen, S., *et al.*, 1991).

En ett-stegs modell for fettfordøyelse simulerer tynntarmen, i all hovedsak duodenum, og studerer aktiviteten av fettfordøyelsesenzymet pankreatisk lipase. De viktigste faktorene som må tas i betraktning når en benytter en *in vitro* fordøyelsesmodell for å simulere oppførselen til lipiddråpene i tynntarmen er: enzymaktiviteten, pH, galletilførsel, fosfolipidinnhold og

mineralinnhold, temperatur og inkubasjonstid (McClements, D. J. *et al.*, 2008, 2010). Som beskrevet tidligere fungerer pankreatisk lipase optimalt ved pH 7-8,5 og tilstedeværelse av gallesalter, fosfolipider og ko-lipase. Gallesaltene kan enten fremme eller hemme aktiviteten av pankreatisk lipase, avhengig av deres konsentrasjon (Lowe, M.E., 2002). Ved relativt lave konsentrasjoner (5-15 mM) vil gallesaltene fremme lipaseaktiviteten, mens relativt høye gallesalkonsentrasjoner vil inhibere lipasen, og hindre den å bryte ned triglyseridene. Hvis mengden fett i fordøyelsen øker, er det viktig at konsentrasjonen av pankreatisk lipase eller inkubasjonstiden øker for at alt fett skal bli fordøyd, selv om de resterende parameterne i fordøyelsesmodellen blir holdt stabile (Hur, J. S., *et al.*, 2011).

I en *in vitro* fordøyelsesmodell der formålet er å studere aktiviteten av pankreatisk lipase, kan ulike lipidsubstrater benyttes som simulator for fett i maten. Det mest benyttede substratet er triglyseridet triolein (Gholamhoseinian, A., *et al.*, 2010), men andre substrater som kan benyttes er, *p*-nitrofenyl laurat (pNP) (McDougall, *et al.*, 2009), *p*-nitrofenyl palmetat (PNP), X-pal (5-bromo-4-kloro-3-indoksypaletat) (Slanc, P., *et al.*, 2009) og 1,2-O-dilauryl-rac-glycero-3-glutar syre-(6-metylnesorufin) ester (kromogent substrat).

*In vitro* fettfordøyelsesmodeller kan benyttes for å studere maksimale fordøyelsesverdier (hvor mye av fett som kan fordøyes på en gitt tid) eller for å måle hydrolysehastigheten. Et mål for begge parameterne kan være å se på frigjørelse av frie fettsyrer ved hydrolyse av triglyserider, ved bestemte inkubasjonstider og andre betingelser (Hur, J. S., *et al.*, 2011).

Ulike matkomponenter kan ha innvirkning på aktiviteten til pankreatisk lipase og dermed påvirke fettfordøyelsen. Cerealier, frukt, bær og grønnsaker inneholder polyfenoler, en stor gruppe plantestoffer, som har vist å ha hemmende effekt på pankreatisk lipase i *in vitro* modeller (McClements, D. J. *et al.*, 2010).

### 1.5 Polyfenoler

I de senere årene har forskere og matvareprodusenter blitt interesserte i en stor gruppe antioksidanter, de såkalte polyfenolene. Det finnes rikelig med polyfenoler i plantebasert mat, som frukt, bær, grønnsaker, poteter, nøtter og urter. Epidemiologiske studier har sett en mulig sammenheng mellom inntak av polyfenolrik mat og forebygging av ulike sykdommer assosiert med oksidativt stress, som kreft og hjerte- og karsykdommer (Karamac, M., *et al.*, 1996, Manach, C., *et al.*, 2004, Scalbert, A., *et al.*, 2000). Nyere forskning viser at polyfenoler modulerer en rekke enzymer og cellereseptorer, og virker ikke nødvendigvis direkte som antioksidanter i kroppen vår (Manach, C., *et al.*, 2004).

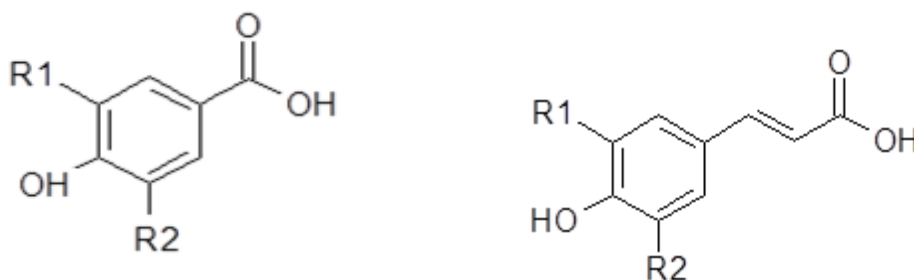
Polyfenoler produseres i plantene som en del av deres forsvarssystem, og kalles også for sekundære plantemetabolitter. De finnes i høye konsentrasjoner i ulike plantedeler, og en del av polyfenolene finnes ofte lokalisert i de ytterste delene av planten, f.eks. i skallet og i deler av planten som er utsatt for sollyset (Herrmann, K., 1976). Polyfenoler har som funksjon å beskytte planten mot sollyset og oksidativt stress, da de er gode radikalfangere, og har antioksidative egenskaper.

Det finnes et stort mangfold polyfenoler, og de deles inn i grupper etter ulik kjemisk grunnstruktur. De har fra enkle til ganske komplekse strukturer, ofte sammensatt av flere fenolgrupper og sukkerenheter. Polyfenoler kan deles inn i hydroksybenzoyl, hydroksykansyler, flavonoider, stilbener og lignaner. Igjen kan flavonoider deles inn i flavonoler, flavoner, isoflavoner, flavanoner, flavanoler og antocyaniner. De sistnevnte er trolig de mest kjente, det er de fargesterke blå-røde antioksidantene i bær og noen grønnsaker. Andre polyfenoler er fargeløse eller svakt gulfargede, som flavonolene i brokkoli. Den svake gulfargen overskygges derimot av den grønne klorofyllfargen hos brokkoli.

Ulikheten i polyfenolenes kjemiske struktur er med på å påvirke deres biologiske egenskaper: biotilgjengelighet, antioksidant aktivitet, spesifikke interaksjoner med cellereseptorer og enzymer osv. For å forstå polyfenolenes effekt er det nødvendig å vite hvilke polyfenoler som er i maten, mengden konsumert, deres biotilgjengelighet og faktorer som er med på å påvirke biotilgjengeligheten (Scalbert, A., *et al.*, 2000).

### 1.5.1 Fenoliske syrer

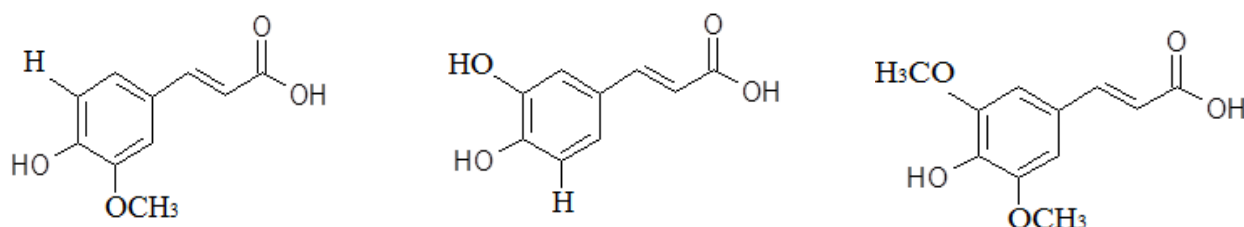
De fenoliske syrene kan deles inn i to hovedgrupper: derivater av hydroksybenzoesyre og derivater av hydroksykanelisyre (se figur 1.7). Innholdet av hydroksybenzoesyrer i spiselige planter er generelt lavt, med unntak av visse røde frukter, svart reddik og løk (Manach, C., *et al.*, 2004). Hydroksybenzoesyre finnes i svært få spiselige planter og er ikke blitt mye studert. Det har derimot hydroksykanelisyre, som hovedsakelig består av kaffesyre (caffeic acid), ferulsyre (ferulic acid), sinapinsyre (sinapic acid) og *p*-kumarsyre (*p*-coumaric acid). Disse syrene finnes sjelden i fri form i planten, utenom i prosessert mat som har blitt lagret eller fermentert. Formene av syrene som finnes i planten er glykosylerte derivater eller estere av kininsyre (quinic acid), shikiminsyre (shikimic acid) og tartarsyre (tartaric acid) (Manach, C., *et al.*, 2004). Derimot finnes syrene i større grad i bundet form, hvor de danner esterbinding til celleveggen (Hole, A.S., *et al.*, 2009)



**Figur 1.7:** Kjemisk struktur av f.v. hydroksybenzoesyre og hydroksykanelisyre

#### 1.5.1.1 Ferulsyre, kaffesyre og sinapinsyre

Ferulsyre, kaffesyre og sinapinsyre (se figur 1.8) er alle hydroksykanelisyre. De er en serie av *trans*-3-fenyl-2-propenoic syrer med C6-C3 struktur, med ulike grupper koblet til fenolringen. De fenoliske syrene finnes ofte som derivater (Fernández-Martínez, E., *et al.*, 2007).



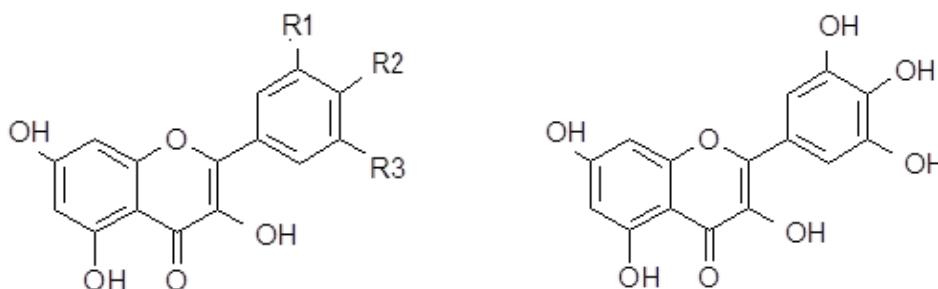
**Figur 1.8:** Kjemisk struktur av f.v. ferulsyre, kaffesyre og sinapinsyre

## INTRODUKSJON

Ferulsyre, kaffesyre og kaffesyre estere er de fenoliske syrene med høyest konsentrasjon i matplanter. Kaffesyre og kininsyre kombineres for å danne klorogensyre. Klorogensyre finnes i mange frukter, i potet og i høye konsentrasjoner i kaffe. Inntaket av klorogensyre vil dermed variere mye i forhold til kaffe inntaket. En enkelt kopp kan inneholde 70-350 mg klorogensyre (Manach, C., *et al.*, 2004). Frukt med høyt innhold hydroksykanelstyrer inneholder 0,5-2 g/kg ferskvekt (Clifford, M.N., 1999). Ferulsyre finnes i høye konsentrasjoner i ulike cerealier. Innholdet av ferulsyre i hvetekorn er ~0,8-2 g/kg tørrvekt, noe som kan utgjøre opp til 90 % av det totale fenolinnholdet i kornet (Manach, C., *et al.*, 2004).

### 1.5.2 Flavonoider

Hovedandelen polyfenoler i mat er av typen flavonoider. I naturen finnes disse som regel i glykosylert form. Glykosyleringen av flavonoidene bidrar til å gjøre forbindelsene mer vannløselige. De glykosylerte formene av flavonoidene er i all hovedsak lokalisert i plantecellenes vakuoler (Onyilagha, J.C., *et al.*, 2004). Den type flavonoider som det finnes mest av er flavonoler, hovedsakelig quercetin og kaempferol (se figur 1.9) (Manach, C., *et al.*, 2004). Quercetin finnes i alle planteprodukter (frukt, grønnsaker, cerealier, fruktjuicer, te, vin osv.) Flavonolene er generelt til stede i relativt lave konsentrasjoner ≈15-30 mg/kg ferskvekt, men dette varierer i henhold til planteproduktet. Planteproduktene med høyest innhold flavonoler er løk (opptil 1,2 g/kg ferskvekt), grønnkål, purre, brokkoli og blåbær. Flavonolene finnes ofte i glykosylert form, hvor den tilhørende sukkerenheten ofte er glukose eller rhamnose, men andre sukker kan også være involvert. Frukt inneholder fem til ti ulike flavonol glykosider, bl.a. quercetin glykosider. Hovedandelen av disse glykosidene finnes i plantens ytre lag (skall og blader) fordi deres biosyntese stimuleres av lys (Manach, C., *et al.*, 2004).



**Figur 1.9:** Kjemisk struktur av f.v. flavonoler og flavonolet quercetin

### 1.5.3 Polyfenoler i maten og deres biotilgjengelighet

Polyfenolinnhold og deres biotilgjengelighet er viktig å ha kjennskap til for å kunne estimere de potensielle gunstige effektene hos mennesker. Polyfenolers biotilgjengelighet sier noe om i hvilken grad polyfenoler vil absorberes i tarmen og tatt opp av kroppens celler (Manach, C., *et al.*, 2004, Olsen, H., *et al.*, 2009).

De vanligste polyfenolene i kosten vil ikke nødvendigvis være de mest aktive i kroppen, enten fordi de har en lavere egenaktivitet eller fordi de blir dårligere absorbert i tarmen. Omfattende kunnskap om polyfenolers biotilgjengelighet er derfor avgjørende dersom man skal forstå deres helseeffekt (Manach, C. *et al.*, 2004). Biotilgjengeligheten er avhengig av både den kjemiske strukturen til polyfenolene og matmatriksen (Olsen, H., *et al.*, 2009). Direkte interaksjon mellom polyfenoler og eventuell andre komponenter kan være med på å påvirke absorpsjonen. En mulig interaksjon kan være binding til proteiner eller polysakkarider. Andre komponenter med effekt på absorpsjon kan være pH, fermentering i tarmen og gallesekresjon (Manach, C. *et al.*, 2004).

De fleste polyfenoler i mat finnes, som tidligere nevnt, i form av estere, glykosider eller polymerer som ikke kan absorberes i tynntarmen i deres opprinnelige form. De må derfor hydrolyseres av fordøyelsesenzymer eller tarmfloraen før de kan absorberes.

Polyfenolsammensetningen i en matvare er ofte ikke kjent, og den begrenser seg til en eller noen få variasjoner og informasjonen som finnes sier ikke alltid noe om de spiselige delene, da hele planten har blitt analysert (Manach, C., *et al.*, 2004). Variasjon i polyfenolinnholdet er relatert til biosyntesen som er påvirket av mange faktorer: sorten, modenheten ved innhøsting, miljøfaktorer, prosessering og lagring (Skrede, G., *et al.*, 2012, Aaby, K., *et al.*, 2012, Aaby, K., *et al.*, 2006).

Eksposering for lys og modenhet har en betydelig effekt på innholdet av de fleste polyfenoler. Det samme har miljøfaktorer, blant annet klimafaktorer som; jordtype, soleksponering og regn, eller agronomiske faktorer som; kultur i veksthus eller felt, biologisk kultur, hydrosystem, fruktavkastning per tre osv (Remberg, S.F., *et al.*, 2010, Bengtsson, G.B., *et al.*, 2007, Hagen, S.F., *et al.*, 2006).



## INTRODUKSJON

Måten maten prepareres/tilbredes på vil ha en innvirkende effekt på polyfenolinnholdet. For eksempel vil enkel skrelling av frukt og grønnsaker fjerne en rekke polyfenoler, ettersom polyfenolinnholdet som oftest er høyere i skallet enn i kjøttet. Produksjon av fruktjuice involverer pressing som fjerner skall og fruktkjøtt, og en stor del av polyfenolinnholdet ender i pressresten (Çam, M., *et al.*, 2010, Holtung, L., *et al.*, upublisert). På grunn av dette har ofte fruktjuice lave flavonoidkonsentrasjoner.

Varmebehandling vil kunne ha stor effekt på polyfenolinnholdet i matproduktet. Etter 15 minutters koking mistet løk og tomater mellom 75 og 80 % av deres opprinnelige innhold av quercetin, mens 65 % ble tapt etter koking i mikroovn og 30 % etter fritering (Crozier, A., *et al.*, 1997). Dette er en indikator på at den beste måten å tilberede grønnsaker på vil være ved dampkoking, da tapet av polyfenoler vil være minst med denne tilberedningen. Studie av masterstudent Silje Johansen viser tap av totale frie fenoler, men derimot økning i frie fenoliske syrer ved koking av bygg.

Lagring har effekt på polyfenolinnholdet ettersom noen polyfenoler lett lar seg oksidere. Oksideringen resulterer i dannelse av polymeriserte substanser, som fører til forandring i matvarens kvalitet, farge, lukt, smak, osv. Slike forandringer kan enten være fordelaktige eller skadelig for forbrukerens aksept for varen (Manach, C., *et al.*, 2004).

Mangfoldet av polyfenoler og en rekke ulike faktorer som kan være med på å påvirke deres konsentrasjon i mat, gjør det vanskelig å estimere eksakt mengde i en matvare (Scalbert, A., *et al.*, 2000). Dette er én av årsakene til hvorfor matvarer ikke merkes med polyfenolinnhold på samme måte som det blir gjort med vitamininnhold (Manach, C., *et al.*, 2004).

## 1.6 Inhibitoriske effekter på pankreatisk lipase

### 1.6.1 Planteekstrakter og polyfenoler

En rekke studier har avdekket helsemessige fordeler med polyfenoler, blant annet en potensiell effekt på forebygging av fedme. Polyfenoler er vist å ha inhibitorisk effekt på fordøyelsesenzymer, deriblant pankreatisk lipase, men også karbohydrat-fordøyende enzymer som  $\alpha$ -glukosidase (Adisakwattana, S., *et al.*, 2011, McDougall, G.J., *et al.*, 2005), og  $\alpha$ -amylase (Kusano, R., *et al.*, 2008, Gu, Y., *et al.*, 2011).

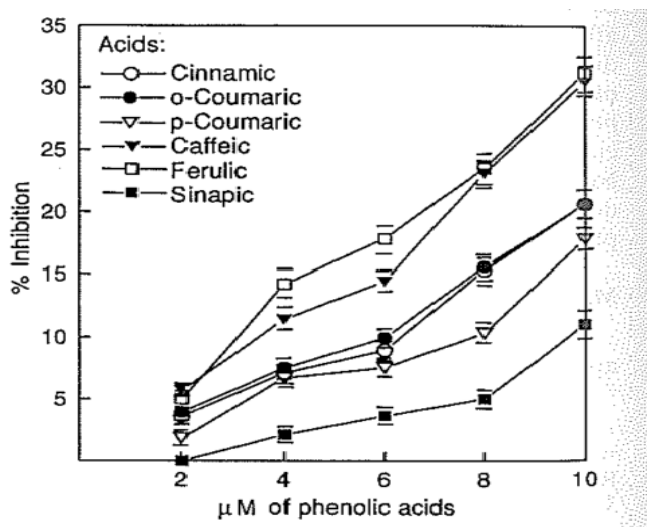
Det er vist at polyfenol rike ekstrakter fra ulike typer plantearter som både egnet som mat og som medisin-planter, hadde hemmende effekt på pankreatisk lipase i kolorimetrisk *in vitro* assays (Slanc, P., *et al.*, 2009, McDougall, G., *et al.*, 2005, 2009). I studien av Slanc, P. *et al.*, ble det testet 132 ekstraktet, og planter fra familiene Brassicaceae (korsblomstfamilien), Ericaceae (lyngfamilien), Fabaceae (erteblomstfamilien), Rosaceae (rosefamilien) og Solanaceae (søtvierfamilien) hadde hemmende aktivitet. I studier av McDougall, G.J., *et al.*, ble det påvist at proantocyaniner, som finnes i en rekke bær, inhiberer lipaseaktiviteten. Spesielt hadde bringebær, jordbær, molte og tyttebær høy inhiberende effekt. Andre studier har vist at drikker som te og kakao, og polyfenolfraksjoner fra disse, hadde inhiberende effekt på lipase (Kusano, R., *et al.*, 2008, Gu, Y., *et al.*, 2011).

Polyfenoler kan binde seg uspesifikt til proteiner gjennom hydrofobe eller hydrofile interaksjoner, og danne løselige eller uløselig komplekser. Polyfenol-protein komplekset kan påvirke biotilgjengeligheten og egenskapene til både proteinet og polyfenolet. Et slikt kompleks kan redusere eller øke antioksidantaktiviteten av polyfenoler, og påvirke effekten av fordøyelsesenzymene i kroppen (Bandyopadhyay, P., *et al.*, 2012).

Polyfenoler kan binde seg direkte til pankreatisk lipase, ko-lipase eller substratet, og på den måten hemme dens mulighet til å binde seg til lipiddråpenes overflater (McClements, D. J. *et al.*, 2010, Gholamhoseinian, A., *et al.*, 2010). Det finnes få publiserte studier som belyser mekanismen for den inhibitoriske effekten av polyfenoler. Én av de få som har forsøkt å forstå denne mekanismen er Karamac, M., *et al.*, 1996. Denne studien tar for seg ulike fenoliske syrer og studerer de individuelle inhibitoriske effektene som disse har på

## INTRODUKSJON

pankreatisk lipase. Resultatene fra studien viser at komponenter som inneholder en metoksygruppe,  $-\text{OCH}_3$ , slik som sinapinsyre er en svak inhibitor av lipase. Det ble også funnet forholdsvis liten inhibering av lipase med komponenter uten hydroksygruppe,  $-\text{OH}$ , slik som benzosyre. Posisjonering av hydroksygruppen i benzenringen så ut til å påvirke lipaseinhiberingen og den inhibitoriske effekten var sterkere når hydroksygruppen satt i *orto*-posisjon i stedet for i *para*-posisjon. Som man ser i figur 1.10 ble kaffesyre og ferulsyre vist å ha størst inhiberende effekt på pankreatisk lipase i denne studien (Karamac, M., *et al.*, 1996).



**Figur 1.10:** Inhibering av pankreatisk lipase med kanelsyre og hydroksykanelsyre derivater (Karamac, M., *et al.*, 1996)

Karamac *et al.*, forsøkte å koble den inhibitoriske effekten opp mot strukturen av de fenoliske syrene, men som sagt er mekanismen lite studert og det kreves klart flere studier for å skaffe seg kunnskap om mekanismene som gir den inhibitoriske effekten av polyfenoler på pankreatisk lipase.

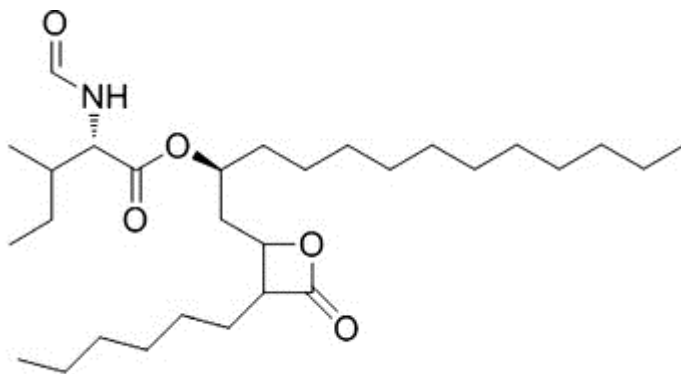
### 1.6.2 Orlistat som lipasehemmer

Orlistat (Xenical, Hoffman-La Roche) er et reseptbelagt anti-fedme medikament som er kjemisk syntetisert hydrogenert derivat av lipstatin, en naturlig forekommende lipase inhibitor produsert av *Streptomyces toxytricini* (se figur 1.11) (Ballinger, A., 2002). Orlistat er en lipasehemmer som opptrer i lumen av magen og i tynntarmen, hvor stoffet danner kovalente

bindinger med et aktivt serin bindingssete på gastrisk og pankreatisk lipase. Dette fører til at enzymene ikke får bundet seg og hydrolysert triglyserider til frie fettsyrer og monoglyserider som kan absorberes i tynntarmen. Ettersom triglyserider ikke blir absorbert og dermed skilles ut i feces, vil det kunne ha en mulig positiv effekt på vekten (Ballinger, B. et al., 2002).

Orlistat egner seg dermed godt som en positiv kontroll ved *in vitro* fordøyelse, og benyttes som det i denne oppgaven (Gu, Y., *et al.*, 2011, Slanc, P., *et al.*, 2009).

Orlistat er tilgjengelig for oral bruk som en gelatin kapsel inneholdende et krystallinsk pulver med lipofile<sup>3</sup> egenskaper og lav løselighet i vann innenfor den fysiologiske pH. Ettersom Orlistat har lav løselighet i vann, vil kun en liten dose av stoffet løse seg i løpet av fordøyelsen. Orlistat er spesifikk for lipase og har ingen signifikant hemmende effekt på andre fordøyelsesenzymmer (Dolenc, A *et al.*, 2010). Hver tablett inneholder 120 mg av den aktive ingrediensen orlistat og en rekke inaktive ingredienser. Anbefalt daglig dose Orlistat er 360 mg, fordelt på tre måltider – en tablett til hvert måltid. En slik daglig dose vil inhibere fettabsorpsjonen med ca. 30 %. Orlistat har vist seg å redusere absorpsjonen av noen fettløselige vitaminer og  $\beta$ -karoten. Ekstra kosttilskudd anbefales derfor ved bruk av Orlistat (Ballinger, A., 2002).



**Figur 1.11:** Kjemisk struktur av lipase inhibitoren Orlistat (Witkamp, R. F., 2011)

<sup>3</sup> Lipofile = Fettløselige. Lipofile stoffer er kjemiske stoffer med upolare egenskaper

## 1.7 Brokkoli (*Brassica oleracea* L. var *italica*)

Brokkoli er en del av korsblomstfamilien og kålslekten, *Brassica*. Brokkolien ble startet dyrket av grekerne og romerne for alt 2000 år siden. Senere, rundt 1925, kom brokkolien til USA med italienske emigranter og har siden blitt en av de viktigste kålvekstene på amerikansk jord. Først i 1940 ble de første forsøkene på å dyrke brokkoli i Norge utført.

Brokkoli ligner veldig på blomkål, men skiller seg fra blomkålen ved å ha et grønt klorofyllrikt hode med blomsterknopper på alle forgreninger (se figur 1.12). Forgreningene er tykke, og har sprø blomsterstilker som strekker seg slik at hode løser seg opp. Brokkolien må høstes før blomsterknoppene vil åpner seg og går ut i blomst (Balvoll, G., 1995).



**Figur 1.12:** Høstklar brokkoli (eget bilde)

*Brassica* grønnsaker er kjent for å inneholde høye konsentrasjoner av fytokjemikalier<sup>4</sup>, som polyfenoler og vitaminer, og ha høy antioksidantkapasitet. Hos brokkoli inneholder særlig brokkoliknoppene ekstra høyt innhold polyfenoler, og da spesielt mye flavonoler, fordi glykosid konsentrasjonen er  $\geq 10$  ganger høyere i de grønne knoppene enn i de lysere stilkene (Manach, C., *et al.*, 2004, Herrmann, K., 1976).

---

<sup>4</sup> Fytokjemikalier: Fellesbetegnelse på helsebringende plantestoffer

Flavonoider som finnes i *Brassica* grønnsaker, deriblant brokkoli, er hovedsakelig derivater av flavonolene kaempferol og quercetin, mens isorhamnetin og myricetin er mindre vanlig. Flavonolene forekommer i plantene som komplekse konjugater, med ett til fem sukkerenheter bundet til et aglykon<sup>5</sup> og de er ofte acetylert med hydroksykaneltsyre. Brokkoli er dermed en kilde både til flavonoler og fenoliske syrer. I en vitenskapelig artikkel av Manach, C., *et al.*, 2004, ble det funnet at rå brokkoli inneholdt 40-100 mg flavonoler/kg ferskt vekt (eller mg/L) (Manach, C., *et al.*, 2004). Studier av Bengtsson, G.B., *et al.*, 2006, viser et innhold av 76-250 mg flavonoler/kg ferskvekt. Totalt innhold flavonoler var fordelt som 18,7-47,4 mg quercetin/kg ferskvekt og 55-210,5 mg kaempferol/kg ferskvekt, og en liten andel isorhamnetin.

## 1.8 Bygg (*Hordeum vulgare*)

Foredlet bygg (se figur 1.13), på latinsk *Hordeum vulgare*, hører til stammen Triticeae i gressfamilien, Poaceae. Triticeae er en temperert plantegruppe og er distribuert de fleste steder i verden, med hoveddyrking i Sentral og Sørvest Asia (Shewry, P.R., 1992). Dagens foredlede bygg stammer fra den ville slekten *Hordeum spontaneum* først oppdaget i Tyrkia av den tyske botanisten Carl Koch (Hadado, T. T. *et al.*, 2009, von Bothmer, R., *et al.*, 2003). I dag er *Hordeum spontaneum* benevnt som en underart av *Hordeum vulgare* (von Bothmer, R., *et al.*, 2003).

Byggkornet består av en inneragn, forblad, selve kornet og hovedakset. Skallet i et modent byggkorn utgjøres av inneragnen og forbladet. Endosperm utgjør største del av kornet I byggrynet ytre lag finner man det som kalles kli og kim. Her befinner de fleste vitaminer, mineraler og polyfenoliske komponentene seg. Fenoliske syrer er tilstede i både bundet og fri form. De frie fenoliske syrene finnes i byggkornets ytre lag, mens hovedandelen fenoliske syrer finnes i bundet form forestret til celleveggene. Andelen av disse er 60:650, frie:bundne (Hole, A.S., *et al.*, 2009, Sahlstrøm, S., *et al.*, 2010). De antioksidative egenskapene vil være forskjellig i de ulike delene av kornet, fordi de fenoliske syrene er ulikt fordelt i byggkornet. Ferulsyre og *p*-comarsyre er de fenoliske syrene som det finnes mest av i bygg, og disse er hovedsakelig konsentrert i aleuronlaget<sup>6</sup> og i skallet (Holtekjølen, A.K., *et al.*, 2006). I en

<sup>5</sup> Aglikon: Del av et molekyl som mangler sukker

<sup>6</sup> Aleuronlaget: Et proteinrikt lag av celler som ligger rett under frøskallet

## INTRODUKSJON

vitenskapelig artikkel av Hole, A.S., *et al.*, 2009, har konsentrasjonen av de ulike fenoliske syrene blitt studert. Konsentrasjonen av de fenoliske syrene i fri form er: 1,28  $\mu\text{g}$  ferulsyre/g byggkorn, 0,82  $\mu\text{g}$  *p*-kumarsyre/g byggkorn, 0,18  $\mu\text{g}$  kaffesyre/g byggkorn og 0,18  $\mu\text{g}$  sinapinsyre/g byggkorn.



**Figur 1.13:** F.v. ulike typer byggkorn. Ulike typer foredlet byggkorn (von Bothmer, R., *et al.*, 2003, Zohary, D., *et al.*, 2000)

### 1.9 Solbær (*Ribes nigrum* L.)

Solbær tilhører ripsfamilien og er mest utbredt i sentral og nord Europa, og i nordlige Asia. Solbær er spesielt populær i Europa hvor den hovedsakelig benyttes i bearbeidede former, som juice, saft, syltetøy osv. Solbær er en rik kilde til C-vitaminer og polyfenoler, spesielt antocyaniner, hydroksykaneltsyre og flavonoler (Määttä-Riihinen, K. R., *et al.*, 2004, Karjalainen, R., *et al.*, 2009). I en studie utført av Karjalainen, R., *et al.*, 2009, viser de et innhold av antocyaniner på 201 mg/100 g ferske solbær, flavonoler på 16 mg /100 g ferske solbær og fenoliske syrer på 23 mg/100 g ferske solbær.

Solbær er en viktig råvare for norsk matindustri, og blir benyttet til produksjon av bl.a. juice, saft og syltetøy. For å lage solbærjuice går bærene gjennom en prosessering hvor skall og frø ender opp sammen med pressresten. Siden skall og frø i solbær er rike på polyfenoler utgjør pressresten dermed en stor kilde til fenoliske komponenter som ville kunne gi næringsmessige fordeler. Pressresten blir i dag ikke benyttet videre i prosessen, men i stedet etterlatt som et

biprodukt. Studier utført ved *Nofima* av doktorgradsstipendiat Linda Holtung har vist at solbærpressrest inneholder ca. tre ganger høyere total fenolkonsentrasjon enn solbær og fire ganger høyere total fenolkonsentrasjon enn solbærjuice. Ca 60 % av fenolkomponentene som opprinnelig var til stede i solbærene ente opp i solbærjuicen, mens de gjenværende 40 % ble hovedsakelig funnet i pressresten (Holtung, L., *et al.*, 2011). Solbærpressrestkonsentratet har blitt laget for å kunne utnytte innholdsstoffene i råvarene bedre. Innhold totale fenoler i solbærpressrestkonsentratet er målt til å være ca. 7700 mg GAE/L (gallesyrekvivalenter per liter) (Holtung, L., *et al.*, upublisert). Pressrestkonsentratet inneholder 2059 mg TAE (totalt antocyanininnhold/L). Størst andel fenoliske syrer i solbærpressrestkonsentratet ble vist å være kaffesyre derivater og kumarsyre derivater, hvor de utgjør hhv 65 og 35 % av totalt innhold fenoliske syrer. Myricetin derivater utgjør størst andel flavonoler i pressresten (Holtung, L., *et al.*, upublisert).

Antocyaniner er antatt å ha lav biotilgjengelighet og/eller dårlig stabilitet *in vivo* (McDougall, G.J., *et al.*, 2005). De vil derfor trolig ikke ha noen stor beskyttende effekt på celler inne i kroppen. En stor mengde av disse polyfenolene fra bær vil kunne passere gjennom øvre mage-tarmkanal uten å absorberes, og passere videre til tykktarmen hvor de metaboliseres av mikrofloraen til ulike aromatiske syrer (Aura, A. –M., *et al.*, 2005, Gonthier, M.P., *et al.*, 2003). Som et resultat kan de helsemessige fordelene avledet fra en diett rik på polyfenoler delvis sees gjennom effekten de utøver i mage-tarmkanalen på blant annet aktiviteten av ulike fordøyelseszymer (McDougall, G.J., *et al.*, 2005).



## 1.10 Prinsipper for målemetoder

### 1.10.1 Kolorimetrisk analyse

Kolorimetrisk analyse benytter seg av fargeintensitet for å bestemme konsentrasjon av et stoff. Fargeintensiteten kan bestemmes ved å måle hvor mye lys som absorberes når lyset går gjennom løsningen. Desto mer lys som absorberes, desto mer konsentrert er prøveløsningen. Konsentrasjonen på løsningen kan bestemmes ved å sammenligne fargeintensiteten på løsningen med fargeintensiteten på løsninger med kjente konsentrasjoner, standardløsninger.

Når fargeintensiteten skal sammenlignes innstilles kolorimeteret slik at den måler absorpsjonen ved den bølgelengden der absorpsjonsspekteret har sitt maksimum. Absorbansen måles for hver standardløsning etter tilsatt reagens. Absorbansen settes på y-aksen og konsentrasjonen på x-aksen. Dette danner en standardkurve som benyttes til å bestemme konsentrasjonen av prøveløsningen ved ønsket absorbans (Grønneberg, T., *et al.*, 2008).

Kolorimetriske analyser benyttes ofte som enzymatisk *in vitro* analyse for kvantitativ bestemmelse av enzymaktivitet. Én type lipase kolorimetrisk analyse (Cobas, Roche/Hitachi) baserer seg på kutting av et kromogent lipasesubstrat; 1,2-O-dilauryl-rac-glycero-3-glutaric acid-(6-methylresorufin) ester emulgert med gallesalter. Lipasesubstratet hydrolyseres av pankreatisk lipase og det dannes 1,2-O-dilauryl-rac-glycerol og et ustabil mellomprodukt, glutaric acid-(6-methylresorufin)ester. Intermediatet brytes ned i basisk løsning og det dannes glutarsyre og metylresoroufin. Dette fører til rødfarge dannelse, hvor fargeintensiteten vil være proporsjonal med lipaseaktiviteten. Lipaseaktiviteten kan dermed bestemmes med et kolorimeter.

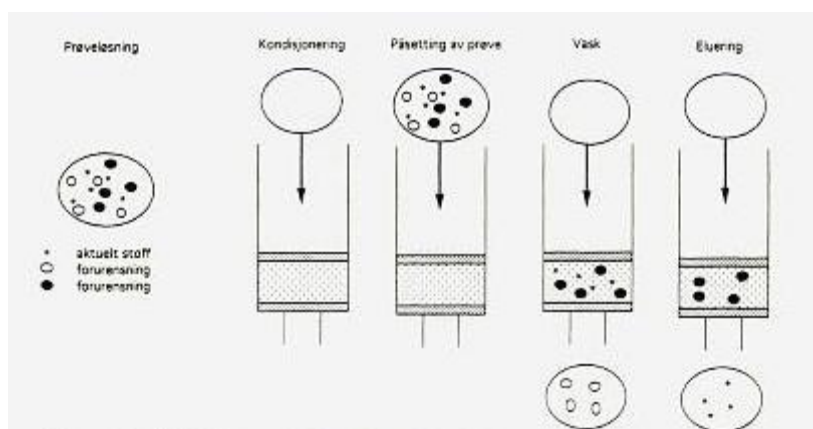
### 1.10.2 Fastfase ekstraksjon (SPE)

Fastfase ekstraksjon, på engelsk kalt solid phase extraction (SPE), er basert på et stoffs fordeling mellom en væske og overflaten til et fast materiale, en sorbent. Fastfase ekstraksjon er en rask og selektiv ekstraksjonsmetode som blir brukt for å isolere, rense og konsentrere stoffer i væsker. For at et stoff skal kunne isoleres på overflaten til en fast sorbent (stasjonærfase) må overflaten ha kjemiske grupper som interagerer med det ønskede stoffet.

Disse interaksjonene må være sterkere enn interaksjonen mellom det ønskede stoffet og væsken det er løst i. En slik selektiv ekstraksjon oppnås ved å bruke sorbenter som gir interaksjon med det ønskede stoffet og ikke med andre uønskede komponenter i prøven. (Greibrok, T., *et al.*, 1994).

Silika er den mest benyttede sorbenten i fastfase ekstraksjon, fordi silika er et fast materiale som ikke sveller eller krymper i ulike løsemiddel og oppnår likevekt raskt i nye løsningsmidler. En fastfase ekstraksjon med silikabasert sorbent kan utføres i pH området 1-14, fordi kontakttiden mellom sorbent og løsningsmiddel er kort (Greibrok, T., *et al.*, 1994).

Ekstraksjonskolonnene er vanligvis laget av polypropylen og pakket med sorbenter, som holdes på plass av et øvre og nedre polyetylenfilter. Kolonnene dimensjoneres etter prøvevolumet som skal opparbeides. Fast fase ekstraksjon består av fire trinn: kondisjonering av sorbent, påsetting av prøve, utvasking av forurensninger og eluering av aktuelt stoff (se figur 1.14). Kondisjoneringen vil aktivere sorbenten, og gjøre den klar for å ta imot prøven ved at et løsningsmiddel fukter de funksjonelle gruppene og silikaoverflaten, og passerer gjennom kolonnen. Ulike løsningsmiddel benyttes i henhold til om fastfase ekstraksjonen er av type omvendt fase ekstraksjon, ionebytter ekstraksjon eller normal fase ekstraksjon. Når prøveløsningen suges gjennom kolonnen blir de ønskede stoffene retardert, og stoffene med svakere interaksjon vaskes ut av kolonnen. De ønskede stoffene elueres så ut, ved bruk av et elueringsmiddel (Greibrok, T., *et al.*, 1994).



**Figur 1.14:** Prinsippene for fastfase ekstraksjon (Greibrok, T., *et al.*, 1994)

1: Kondisjonering av sorbent, 2: Påsetting av prøve, 3: Utvasking av forurensninger, 4: Eluering av aktuelle stoffer

### 1.10.2.2 Normal fase ekstraksjon

En normal fase ekstraksjon benyttes for å ekstrahere stoffer med polare funksjonelle grupper fra ikke-vandige løsninger. Retensjonen baserer seg på polare interaksjoner, som hydrogenbinding, dipol-dipol interaksjon og andre interaksjoner, mellom ønsket stoff og sorbent. Stoffer med en polar funksjonell gruppe vil interagere med en polar sorbent. Polare interaksjoner fremmes av upolare løsningsmidler og brytes av polare løsningsmidler.

Løsningsmidler som benyttes for kondisjonering i normal fase ekstraksjon er løsningsmidler med lavere eller lik løsningsmiddelstyrke som prøveløsningen. Dette er for at prøven skal være løst i et løsningsmiddel med så svak elueringsstyrke at det ønskede stoffet blir fullstendig retardert til sorbenten (Greibrok, T., *et al.*, 1994).

Sorbenten vaskes med et polart løsningsmiddel, som vil vaske ut mindre polare forurensninger. Det ønskede stoffet elueres så ut med et løsningsmiddel med nok styrke til at de polare bindingene mellom stoffet og sorbenten brytes (Greibrok, T., *et al.*, 1994).

### 1.10.2.3 Automatisering av normal fase ekstraksjon

Å utføre en fast fase ekstraksjon manuelt er svært tidkrevende og resultatet vil bero mye på erfaringen til den som utfører ekstraksjonen. Utvinningen og reproduserbarheten kan være faktorer som føre til enorme variasjoner i resultatene (Zweigenbaum, J., 2011). Ved benyttelse av robotiserte instrumenter kan fast fase ekstraksjonen automatiseres, og dermed bli mer effektiv og pålitelig. Gerstel MultiPurpose Sampler MPS 2XL Twister er et slikt instrument (se figur 1.15). Instrumentet er basert på standard 1 mL, 3 mL, og 6 mL kolonner (Gerstel Operation Manual).

### 1.10.2.4 Normal fase ekstraksjon til fett fraksjonering

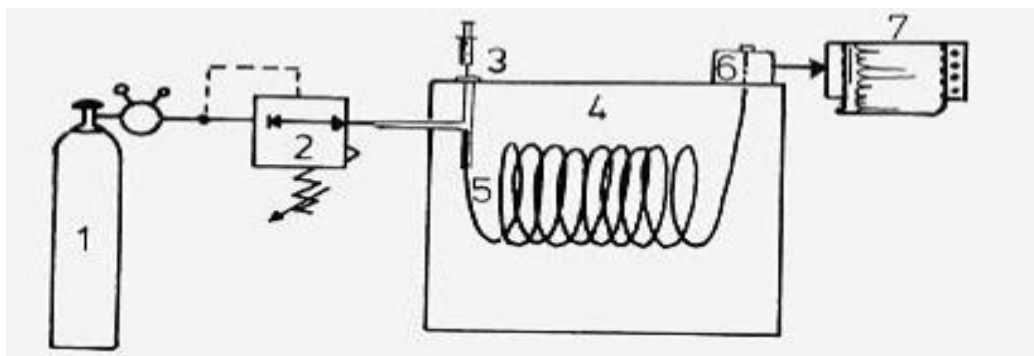
Normal fase ekstraksjon benyttes til fraksjonering av triglyserider, frie fettsyrer og fosfolipider i en prøve. I et slikt tilfelle benyttes kolonner med aminopropyl (NH<sub>2</sub>) som sorbent, og kloroform som kondisjoneringmiddel. For fraksjonering av de ulike lipidklasene elueres triglyseridene med kloroform:metanol 95:5, frie fettsyrer med diethyleter:eddiksyre 99:1 og fosfolipider med metanol:kloroform 6:1 + 0,05 M NaHCO<sub>3</sub>.



**Figur 1.15:** Instrumentet Gerstel MultiPurpose Sampler MPS 2XL Twister – automatisert fast fase ekstraksjon (eget bilde)

### 1.10.2.5 Kromatografi

Kromatografi er et samle navn på separasjonsmetoder som er basert på det prinsipp at stoffene som skal separeres fordeler seg mellom to faser; mobilfasen og stasjonærfasen. Mobilfasen kan være enten væske eller gass, som strømmer gjennom kolonnen med stasjonærfasen, ofte ved hjelp av høypresisjonspumper. Ved benyttelse av gass som mobilfase kalles kromatografiprinsippet for gasskromatografi. Ved separasjon av lipider benyttes gass-væske kromatografi (GLC) hvor den stasjonære fasen er en ikke-flyktig væske og mobilfasen er en bæregass. (Greibrokk, *et al.*, 1994, Christie, W.W., 1989). Figur 1.16 viser en skjematisk presentasjon av en gasskromatograf.



**Figur 1.16:** Skjematisk presentasjon av en gasskromatograf (Greibrokk, T., *et al.*, 1994)

## INTRODUKSJON

En gasskromatograf består av en høytrykksylinder med bæregass (1), reduksjonsventil (2), injektor (3), kolonneovn (4), kolonne (5), detektor (6) og skriver (7). Bæregassen oppbevares på høytrykksylinderen og strømmer gjennom injektoren og kolonnen, til den når detektoren. Bæregassens primære oppgave er å frakte fettsyremetylerne gjennom kolonnen. Gassen er inert og reagerer ikke med prøven eller stasjonærfasen. De mest benyttede bæregassene er helium og hydrogen. Når prøven introduseres i den oppvarmede injektoren vil den fordampe og bringes til kolonnen av bæregassen. Komponentene i prøven strømmer med bæregassen gjennom kolonnen med stasjonærfasen hvor de separeres og passerer til slutt detektoren hvor det genereres et elektrisk signal som gir opphavet til et kromatogram (Greibrokk, *et al.*, 1994). Kromatogrammet lagres som en datafil og arealene av toppene integreres med en software.

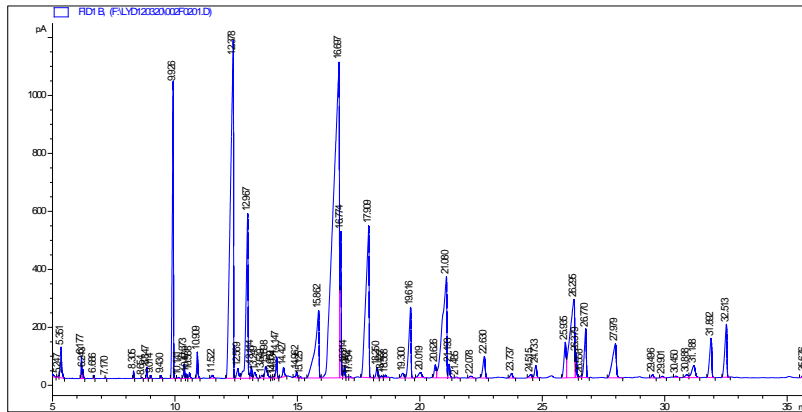
Ulike komponenter i en prøve vil bevege seg med ulik hastighet igjennom kolonnen i fordi de i ulik grad vil diffundere inn i stasjonærfasen og på den måten bevege seg nedover i kolonnen med ulik hastighet. Komponentene har ulik affinitet på grunn av ulik polaritet, kjedelengde og umetthet med påfølgende ulik flyktighet. Det er denne ulikheten i vandringshastigheten som danner basisen for den kromatografiske separasjonen. Vandringshastigheten bestemmes av komponentenes likevektsfordeling mellom stasjonær- og mobilfasen. Molekyler i stasjonærfasen har ikke mulighet til å bevege seg, så det er molekylene i mobilfasen som avgjør stoffenes hastighet gjennom kolonnen. Den mest benyttede detektoren ved analyser av fettsyrer er flammeionisasjonsdetektoren (FID) (Greibrokk, *et al.*, 1994, Christie, W.W., 1989).

### 1.10.3 Flammeionisasjonsdetektor (FID)

Prinsippet for en slik ionisasjonsdetektor er at den elektriske ledningsevnen i gassen er proporsjonal med konsentrasjonen av ladede partikler i gassen. Detektoren oppdager analytter ved å måle elektrisk strøm generert av elektroner fra brennende karbonpartikler i prøvene.

Bæregassen i kolonnen blandes med H<sub>2</sub> og forbrennes under overskudd av luft, og ledes inn i detektoren. Under forbrenning i flammen dannes ioner og frie elektroner, og det vil gå en strøm i detektoren som vil være proporsjonal med mengde stoff som forbrennes. Hvis kun bæregassen passerer detektoren vil skriveren tegne en rett linje. Denne linjen kalles baselinjen. Derimot ved forbrenning av organiske stoffer vil det skrives ut topper på skriveren (Greibrokk, *et al.*, 1994). Figur 1.17 viser et kromatogram etter analyse av

fettsyresammensetningen på et gasskromatogram. Hver topp i kromatogrammet viser en bestemt fettsyre. Fettsyrene separeres i kolonnen på grunn av ulik karbonkjedelengde, ulik grad av umettethet og posisjonsisomerisering i fettsyrene (Christie, W.W., 1989).



**Figur 1.17:** Kromatogram som viser separasjon av fettsyrer (eget kromatogram)

## 2 Formålet med studien

Epidemiologiske studier har vist at inntak av cerealier, grønnsaker, frukt og bær kan gi nedsatt risiko for utvikling av livsstilssykdommer. Overvekt og utvikling av metabolsk syndrom er et økende helseproblem i Norge. Fordøyelsessystemet er viktig for metthetssignalisering og vektkontroll, og nyere forskning har blant annet antydnet at hemming av fettfordøyelse kan gi økt metthet. Det vil derfor være av interesse å studere påvirkningen ulike plantematerialer og rene plantestoffer har på fordøyelsesenzymer som pankreatisk lipase som bryter ned fett i tynntarmen. For å kunne studere *in vitro* fordøyelse av fett, er det behov for å benytte en *in vitro* simulering av duodenaltrinet, med fokus på aktiviteten til pankreatisk lipase. Det må da kartlegges hvilke *in vitro* modeller som finnes, om noen av disse er aktuelle å teste ut, eller om en ny må etableres.

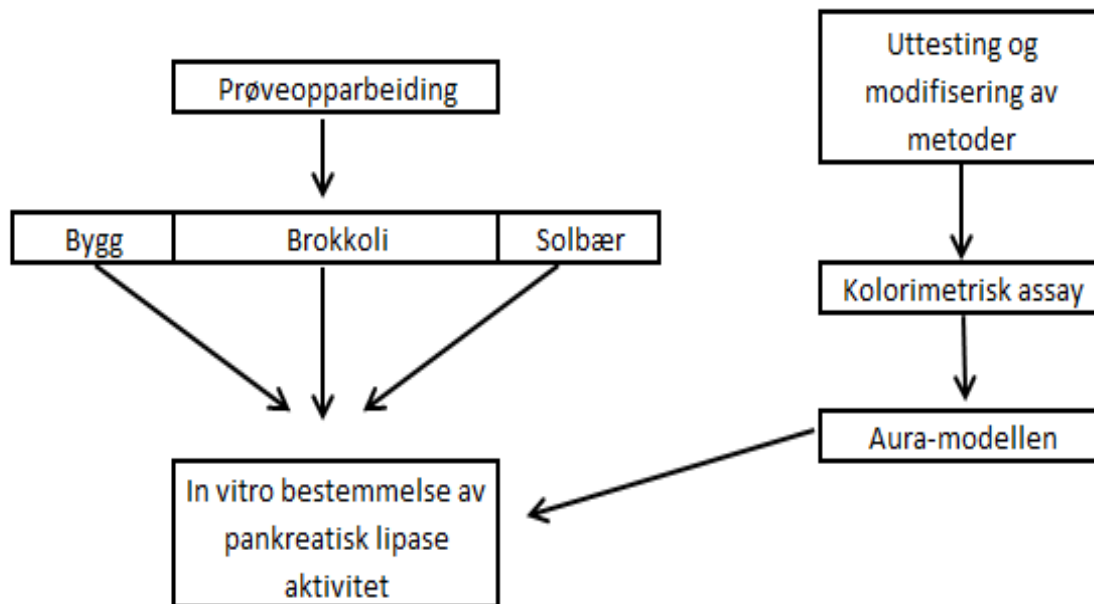
Delmålene underveis vil derfor være:

- Opparbeide kunnskap om ulike kjemiske komponenter som finnes i plantematerialer, med fokus på polyfenoler.
- Opparbeide egnet prøvemateriale i riktig konsentrasjon for lipase studier.
- Bestemme hvilke *in vitro* modeller for fordøyelse av fett som kan være aktuelle, og teste ut disse.
- Etablere og optimalisere en *in vitro* modell for fordøyelse av fett, egnet for å studere aktiviteten til pankreatisk lipase.
- Studere effekten av plantematerialer og rene plantestoffer på pankreatisk lipase ved bruk av den etablerte *in vitro* fettfordøyelsesmodellen.

### 3 Materialer og metoder

Dette studiet har omfattet opparbeidelse av prøvematerialer, utvikling av metode til å bestemme aktiviteten av pankreatisk lipase og benyttelse av den endelige modellen for *in vitro* å måle lipaseaktiviteten (se figur 3.1).

Plantematerialet som ble benyttet er en del av et større prosjekt (NFR prosjektet ”Det Sunne Måltid”) hvor prøvematerialet karakteriseres kjemisk og benyttes for å studere andre typer bioaktivitet.



**Figur 3.1:** Flytskjema for prøveopparbeidelse, uttesting og modifisering av metoder, og hvordan de til slutt slås sammen for *in vitro* å bestemme pankreatisk lipase aktivitet



## 3.1 Prøveopparbeidelse og prøvemateriale

### 3.1.1 Brokkoli og brokkoliknopper

Brokkoli benyttet i denne oppgaven var av sorten Ironman og ble dyrket på Skallerød gård, Jeløy, Moss i 2010. Brokkolien ble høstet ved kommersielt høstetidspunkt og lagret mørkt ved 2 °C i ett døgn, frem til den ble delt i buketter. Buketter med vekt over 36 g ble delt i to. Rå brokkolibuketter ble så fryst raskt ned vha. flytende nitrogen, vakuumpakket og lagret ved -40 °C frem til de ble benyttet videre i dette og andre forsøk i NFR prosjektet ”Det Sunne Måltid”.

Brokkolibukettene besto av stilker og små blomsterknopper ytterst. Det ble kun benyttet brokkoliknopper i studien (se figur 3.2), og disse ble skilt fra stilkene jfr. egen prosedyre og utført av mastergradsstudent Silje Johansen, *Nofima*. Brokkoliknoppene ble oppbevart ved -80 °C til videre analyser.



**Figur 3.2:** Brokkoliknopper

#### 3.1.1.6 Frysetørking av brokkoliknopper

Frysetørking av brokkoliknopper ble utført for å redusere vanninnholdet og for å få et prøvemateriale som er enklere å håndtere videre i analyser enn ferske brokkoliknopper som lett kan tine og degraderes.

Fryste brokkoliknopper ble tatt opp fra  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  og ble holdt frosne inntil innveiging vha. flytende nitrogen. Innveiningen ble foretatt raskt for å unngå tining, da dette kan påvirke innholdstoffene i materialet. Det ble veid inn 18,0 g brokkoliknopper i et nedkjølt beger med kork ved bruk av nedkjølt skje for å unngå tining av knappene ved kontakt med skjea. Korken på begeret ble løsnet litt slik at begeret ikke ble sprengt av vakuemet fra frysetørkeren. Frysetørking av brokkoliknoppene ble utført i 4 dager ved bruk av frysetørker *Christ, Gamma 1-16 LSC (SciQuip Ltd, Shrewsbury, UK)*. Vekten av materialet etter frysetørkingen ble notert, og tørrstoffinnholdet ble beregnet. Den frysetørkede brokkolien ble mortet i en keramisk morter til et fint pulver. Deretter ble materialet overført til 50 mL før det ble lagret ved  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  inntil forsøkene ble utført.

### 3.1.1.7 Ekstraksjon av brokkoliknopper

Polyfenoler er semi-polare stoffer løselig i metanol. For å ekstrahere polyfenoler fra brokkoliknoppene ble det derfor utført metanolekstraksjon.

Metoden som ble benyttet er utviklet på *Nofima* for ekstraksjon av grønnkål (Olsen, L., *et al.*, 2009). Fryste brokkoliknopper ble tatt opp fra  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  fryser og holdt frosne inntil innveiging.

5,0 g rå, fryste brokkoliknopper ble veid direkte inn i 40 mL sentrifugerør og både rør og skje var nedkjølte for å unngå tining av knappene. Utveiging av ny prøve ble gjentatt en gang, slik at det ble laget to paralleller. Det ble raskt tilsatt 15 mL 100 % metanol (*Merck*) og prøven ble homogenisert med knivhomogenisator av typen *Polytron PT3100* ved 28 000 rpm i 50-60 sekunder. Prøven ble deretter sentrifugert ved 17 000 rpm i 10 minutter ved  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  med rotor *JA20* i en *Beckman Coulter, Avanti J-26 XP* sentrifuge. Supernatanten ble forsiktig helt over i en målesylinder som sto på is. Pelleten ble tilsatt 10 mL 80 % metanol og resuspendert ved bruk av en glasstav. Prøven ble deretter sentrifugert som over. Supernatanten ble overført til samme målesylinder og totalt volum av ekstraktet målt. De to parallellene ble slått sammen for å få en større ensartet prøve (batch). Prøven ble fordelt i rør (se figur 3.3) og fryst ned ved  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  frem til det ble benyttet til lipasestudier.



**Figur 3.3:** Fryst brokkoliekstrakt

### 3.1.2 Bygg

Bygg benyttet i denne oppgaven var hele byggryn fra Sjøk Mølle (se figur 3.4). Hele byggryn ble benyttet i stedet for kommersielt mel fordi ulike stoffer, som fenoliske syrer, finnes i stor mengde i byggrynets ytre lag, og som man finner lite av i mel.

15 g hele byggryn ble malt på *Retsch ZM 100* mølle som hadde sikt med partikkelstørrelse 0,5 mm. Møllen ble startet og byggrynet ble tilsatt. Når alt byggrynet var malt ble melet overført til plastbeger og oppbevart tørt ved romtemperatur inntil forsøkene ble utført.



**Figur 3.4:** Hel og malt byggryn

### 3.1.2.8 Ekstraksjon av bygg

Det ble benyttet samme ekstraksjonsmetode som for ekstraksjon av brokkoliknopper. Byggmelet var ikke nedfrost og det var derfor ikke nødvendig å holde ting på is før innveining.

Byggeekstraktet ble lagret ved - 80 °C.

### 3.1.3 Solbærpressrest

Polyfenolene sitter i frøene og i skallet hos solbær. Ved produksjon av juice vil derfor mye av polyfenolinnholdet gå tapt. I denne oppgaven ble det derfor benyttet en solbærpressrest (se figur 3.5) gjenværende etter laging av solbærjuice produsert av Findus Lier. Et konsentrat av solbærpressresten ble laget av doktorgradsstipendiat Linda Holtung, *Nofima*.

Solbærpressrestkonsentratet ble som ble benyttet i forsøkene var lagret ved – 80 °C, og på forsøksdagen ble rør med konsentratet tatt opp og satt til tining i kaldt vann.

Deretter ble det foretatt en pH justering av juicen for at den ikke skulle surgjøre enzym assayet. pH i det tinte solbærpressrestkonsentratet ble justert fra pH ~3 til pH ~7 med NaOH. Det ble utført ved å ta ut en prøve på 10 mL juice som ble tilsatt 400 µL 10 M NaOH dråpevis for å oppnå pH ~7. Når pH nærmet seg 7 ble 0,1 og 1 M NaOH benyttet og tilsatt dråpevis inntil pH 7.0.



**Figur 3.5:** Fryst solbærpressrestkonsentrat

### 3.1.4 Fenoliske syrer

Det ble også benyttet kommersielle renfremstilte stoffer til forsøkene med lipaseinhibering. Fenoliske syrer er stoffer som kan ha effekt på lipasen, og er derfor av interesse å studere. De fenoliske syrene som ble benyttet i denne studien var: Ferulsyre (*Fluka*), sinapinsyre (*Fluka*) og kaffesyre (*Sigma-Aldrich*).

Forsøksoppsett 1 med sinapinsyre og kaffesyre: Det ble veid inn 1,00 mg sinapinsyre og 0,50 mg kaffesyre i hver sin 50 mL flaske med skrukork. Prøvene ble løst i 20 mL 70 % metanolvann løsning. Det ble så laget en 10x og 100x fortynningsserie av stamløsningen ved å fortynne med destillert vann.

Forsøksoppsett 2 med kaffesyre og ferulsyre: Det ble veid inn 2,00 mg fra hver av de to fenoliske syrene i hver sin 50 mL flaske med skrukork. Fenolene ble løst opp i 8 mL 100 % metanol, og deretter ble 32 mL destillert vann tilsatt slik at metanolkonsentrasjonen ble 20 %.

Nylagede løsninger ble benyttet til hvert forsøk da de fenoliske syrene kan degraderes og konsentrasjonen endres under lagring.

### 3.1.5 Flavonoler

Et annet renfremstilt stoff benyttet i forsøkene var flavonolet quercetin (*Sigma-Aldrich*). Quercetin er i likhet med fenoliske syrer et stoff med mulig effekt på lipasen.

Det ble veid inn to prøver quercetin hver av 19,50 mg i 15 mL rør (*Kimax*). De ble begge løst i 2 mL 100 % metanol. Quercetinpulver løser seg dårlig i lave metanolkonsentrasjoner, men for å unngå for høye lokale metanolkonsentrasjoner i lipase assayet ble den ene prøven dampet inn til nesten tørt stoff vha nitrogen og reløst i 20 % metanol opp til 2,00 mL. Den andre prøven ble derimot ikke dampet inn for å studere om 100 % metanol ville påvirke effekten av flavonolet.

## 3.2 Uttesting og modifisering av metoder for bestemmelse av pankreatisk lipase aktivitet

Som beskrevet i teorien finnes en rekke *in vitro* modeller for studier av fordøyelse, inkludert ett-trinns modeller for bestemmelse av enzymaktiviteter. To ulike *in vitro* metoder for bestemmelse av pankreatisk lipase aktivitet ble testet i denne oppgaven, da en slik metode ikke var ferdig etablert da denne oppgaven ble påbegynt. Den første var et kolorimetrisk *in vitro* assay, og den andre en *in vitro* lipid fordøyelse med kommersiell pankreatisk lipase. Den sistnevnte metoden ble videreutviklet for å benyttes til å bestemme av lipaseaktiviteten.

### 3.2.1 Kolorimetrisk *in vitro* assay for bestemmelse av lipaseaktivitet

Det finnes kommersielle kits for å måle lipaseaktivitet i blod for automatiserte instrumenter på f eks sykehus. Et slikt assay er 'Cobas Lipase colorimetric assay' fra Roche. Dette har blitt benyttet for å måle lipaseaktivitet i human magesaft (Ulleberg, E.K., *et al.*, 2011).

Et slikt assay ble testet ut i denne oppgaven, men magesaft ble byttet ut med kommersiell pankreatin av pankreas fra svin (*Sigma-Aldrich*, P1750, 4xUSP) og gallesaltblanding fra storfe og sau (*Sigma-Aldrich*, B8381).

Det kommersielle kittet fra Roche inneholdt to reagenser:

**R<sub>1</sub> - kalibreringsløsning:** BICIN (N,N-bis(2-hydroxyethyl)-glycine) buffer: 50 mmol/L, pH 8,0, colipase (pankreas fra svin)  $\geq 0,9$  mg/L, Na-deoksykolat: 1,6 mmol/L, kalsiumklorid: 10 mmol/L, vaskemiddel og konserveringsmiddel

**R<sub>2</sub> – kromogent lipase substrat:** Tartrate buffer: 10 mmol/L, pH 4,16, 1,2-O-dilauryl-rac-glycero-3-glutaric acid-(6-methylresorufin) ester, 0,27 mmol/L, taurodeoksykolat: 8,8 mmol/L, vaskemiddel og konserveringsmiddel

77,6 mg pankreatin og 600 mg galle ble veid inn direkte i et glassrør (*Kimax*), fortynnet med 4 mL 0,9 % NaCl og satt på is. Det ble så laget fortynningsserie av stamløsningen, 1:20, 1:40, 1:60 og 1:80 ved å fortynne med 0,9 % NaCl-løsning. Det ble kjørt tre parallelle 96 brønners

## MATERIALER OG METODER

mikrotitrerplater hvor hver av prøvekonsentrasjonene ble tilsatt som triplikater i alle tre platene. To kontroller ble benyttet i assayet: 1,2 mg lipase av pankreas fra svin, type II (*Sigma-Aldrich*, L3126) fortynnet med 2 mL 0,9 % NaCl og blank, en blanding av R<sub>1</sub> og R<sub>2</sub>.

Mikrotiterplatene ble satt på is, slik at enzymene ikke ville aktiveres før dette var ønskelig. Prøvene ble tilsatt platene i økende mengder: Tre brønner 5 µL, tre brønner 10 µL, tre brønner 15 µL og tre brønner 20 µL, av hver av fortynningene, til sammen 48 brønner. Det samme ble gjort med lipase løsningen, tre brønner 5 µL, tre brønner 10 µL osv., til sammen 12 brønner. Alle de 60 benyttede brønnene, samt tre brønner til kontroll, ble tilsatt R<sub>1</sub>, til hver brønn hadde et totalvolum på 125 µL. Én av platene ble så satt til inkubering i 5 minutter ved 37 °C ved bruk av *SPECTROstar Nano* (BMG LABTECH), for å aktivere enzymene. De to andre platene ble fortsatt stående på is. Straks etter 5 minutters inkubering ble 75 µL R<sub>2</sub> (37 °C) tilsatt til alle brønnene, til sammen 63 brønner. Prøvene ble så avlest fotometrisk ved bruk av *SPECTROstar Nano*, som på forhånd ble innstilt til å holde en temperatur på 37 °C, bølgelengde på 595 nm, og utføre målinger av absorbans hvert 40. sekund, 8 ganger. Samme metode ble gjentatt for de to resterende platene.

Absorbansen av prøvene ble korrigert ved å trekke fra absorbansen i den blanke prøven (R<sub>1</sub>+R<sub>2</sub>). Den korrigerede absorbansen ble så benyttet for å bestemme lipaseaktiviteten. Det ble laget en standardkurve og ligningen for denne ble benyttet til å beregne units. Én unit er definert som mengden (i mL) av pankreatin/galle-blandingen som gir en ulikhet i hastighet ( $\Delta OD$ , ratio av methylresorufin produksjon) (se Innledning 1.10.1) på 1.0 ved 595 nm/min ved 37 °C (Ulleberg, E.K., *et al.*, 2011).

### 3.2.2 *In vitro* lipid fordøyelse med kommersielt pankreatisk lipase enzym

Ved kolorimetrisk analyse ble et kolorimetrisk lipase substrat benyttet. En annen metode som ble testet ut var en mer fysiologisk lik metode som benytter lakseolje som lipidsubstrat, der lipaseaktiviteten måles ved frigjøring av frie fettsyrer. Lakseolje er et reelt substrat for pankreatisk lipase i *in vivo* fordøyelse, og ble derfor valgt som substratet for *in vitro* fordøyelse av fett i denne oppgaven. Metoden som ble benyttet er en del av en *in vitro* simulert fordøyelsesmodell, men omfatter kun lipid fordøyelsestrinnet og måling av pankreatisk lipase aktivitet.

En *in vitro* fordøyelse med bruk av kommersielt pankreatisk lipase enzym ble utviklet i samarbeid med doktorgradsstipendiat Kristi Ekran Aarak, der det ble tatt utgangspunkt i volum og mengde kjemikalier fra den publiserte Aura-modellen (Aura, A., *et al.*, 1998), en modell for hydrolyse av stivelse og proteiner. Modellen ble videre modifisert og optimalisert og hvor et maksimalt utbytte frie fettsyrer var ønskelig.

### 3.2.2.1 Type lipid, mengde substrat og positiv kontroll

Det ble gjort en beregning på hvor mye lakseolje som burde benyttes i *in vitro* lipid fordøyelse med kommersielt pankreatisk lipase enzym. Det ble tatt utgangspunkt i hvor mye laks som inntas til et typisk måltid, som i prosjektet ”Det Sunne Måltid” er definert som 180 g rå laks. Denne laksemengden inneholder ~25 g fett (lakseolje). *In vitro* fordøyelsen er valgt å nedskaleres 200 ganger mhp væskevolum og matmengde, og mengde substrat i assayet ble da 125 mg lakseolje. En slik nedskalering ble foretatt for å optimalisere forholdene for videre analyser med gasskromatografi, da 125 mg vil være en passende mengde for dette formålet. Mengden substrat ble holdt konstant gjennom alle analyseforsøkene, der 125 mg lakseolje, tilsvarende 141 µL, ble tilsatt med pipette.

Lakseoljen brukt i denne oppgaven var fra Denomega (Borregaard-Sarpsborg). Oljen ble oppbevart ved -40 °C, så tint og overført til flere 1,5 mL rør og lagret videre ved -40 °C. Ca. 20 minutter før forsøket startet, ble det tatt ut det antall rør som var nødvendig, og oljen ble tint.

I forsøkene ble lakseoljen fordøyd sammen med lipase inhibitoren Orlistat. Orlistat kapslene ble målt til å inneholde ~239 mg krystallinsk pulver (n=3), og én slik kapsel benyttes til ett måltid. Ettersom *in vitro* fordøyelsen ble nedskalert 200 ganger i forhold til mengder for et måltid, så ble  $239/200=1,2$  mg Orlistat benyttet som en positiv kontroll ved hver analyse.

### 3.2.2.2 Mengde prøvemateriale

Mengde av de ulike matproduktene som skulle benyttes i forsøkene ble bestemt ut fra et typisk måltid. I prosjektet ”Det Sunne Måltid” har kommet frem til at en vanlig middag er antatt å inneholde 150 g kokt laks (180 g rå), 125 g kokt brokkoli og 150 g kokt bygggris. *In vitro* fordøyelsen ble som beskrevet tidligere nedskalert 200 ganger med hensyn på



## MATERIALER OG METODER

væskevolum og matmengde til å bestå av henholdsvis 750 mg kokt laks, 625 mg kokt brokkoli og 750 mg kokt byggris.

### 3.2.2.3 Mengde gallsalter, natriumbikarbonat og pankreatisk lipase

For å lage en *in vitro* fettfordøyelses modell med kommersiell pankreatisk lipase mest mulig lik de fysiologiske forholdene *in vivo*, ble mengde gallsalter, natriumbikarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ ) og pankreatisk lipase forsøkt optimalisert. Målsetningen var å oppnå en optimal frigjørelse av frie fettsyrer fra oljen.

*In vitro* simulering av lipase fordøyelse ble utført ved benyttelse av en gallsalt blanding fra storfe og sau (*Sigma-Aldrich*, B8381) og pankreatin av pankreas fra svin (*Sigma-Aldrich*, P1750, 4xUSP). Gallsaltinnholdet *in vivo*, varierer hos mennesker fra 5-15 mM. I denne oppgaven ble det benyttet en gallsaltkonsentrasjon på 11,8 mM. To ulike batcher gallsalter ble benyttet under forsøkene. Analyser utført ved Norges Veterinærhøgskole (NVH) viste noe ulikt innhold i de to batchene. Mengden galle ble imidlertid justert slik at gallekonsentrasjonen forble 11,8 mM i sluttvolumet.

### 3.2.2.4 Sammensetning av *in vitro* lipid fordøyelsesmodellen

Optimale mengder av de ulike komponentene i lipase assayet ble som nevnt tidligere, bestemt ut fra maks frigjørelse av frie fettsyrer (FFA/g lakseolje), noe man fant til å være ved et totalvolum på 8,1 mL med innhold av ulike komponenter som vist i tabell 3.1.

**Tabell 3.1:** Sammensetningen av galle, natriumbikarbonat, natriumklorid, vann og pankreatisk lipase (pankreatin) i *in vitro* assayet med et totalvolum på 8,1 mL

|                                 | <i>mg</i>         | <i>mL</i> |
|---------------------------------|-------------------|-----------|
|                                 | <i>per 8,1 mL</i> |           |
| <b>Pankreatin</b>               | 9,72              | -         |
| <b>Galle</b>                    | 71,21             | -         |
| <b>0,15 M NaHCO<sub>3</sub></b> | -                 | 1,13      |
| <b>0,9 % NaCl</b>               | -                 | 2,43      |
| <b>Destillert vann</b>          | -                 | 4,54      |
| <b>Lakseolje</b>                | 125               | 0,141     |

Et totalvolum på 8,1 mL inneholdt følgende: 71,21 mg galle (11,8 mM) og 9,7 mg pankreatin veid inn direkte i 50 mL glassrør (*Kimax*) og satt på is frem til alle prøvene var innveid. Så ble alle rørene tilsatte 1,13 mL 0,15 M natriumbikarbonat, NaHCO<sub>3</sub> (*Merck*) (pH~9), 2,43 mL 0,9 % natriumklorid, NaCl (*Merck*) og 4,54 mL destillert vann. pH ble justert til 7,0 (*Metrohm, 827 pH lab*) ved bruk av 2,0 M saltsyre, HCl (*Merck*). Påfølgende lipid fraksjonering utført vha. GERSTEL MultiPurpose Sampler MPS 2XL Twister (Se Materialer og metoder, 3.3.1) kan kun ta ti prøver samtidig, derfor ble ti prøver kjørt hver gang og forberedt i denne delen.

#### 3.2.2.1 *In vitro* fordøyelse med fosfatbuffer (PBS)

Samme metode for *in vitro* lipase fordøyelse som beskrevet ovenfor, men 0,15 M PBS ble testet ut som en erstatter for NaHCO<sub>3</sub> og NaCl for å se om bufferkapasiteten i assayet ble bedre ved tilsetning av sure matekstrakter (bær).

##### 3.2.5.1.2 Tillaging av PBS

Det ble laget 0,15 M PBS ved å veie inn 2,00 g di-natriumhydrogenfosfat, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (*Merck*) og 1,80 g natrium-di-hydrogenfosfat, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (*Merck*) i hver sin 100 mL målekolber og

fortynnet til merket med destillert vann. De to løsningene ble blandet etter standard oppskrift i et forhold slik at pH ble ~7,4.

### 3.2.3 *In vitro* fordøyelse av fett/olje med pankreatisk lipase

Aktiviteten ble målt ved frigjøring av FFA fra oljen. For å gjøre dette mulig ble frie fettsyrer etter lipasebehandling separert vha. fast faseekstraksjon (SPE) og deretter metylert for å omdanne lipidene til fettsyremetylestere som er mulig å analysere på en gasskromatograf med flammeionisasjonsdetektor (FID).

Prøvene ble satt i varmeskap med risting (*New Brunswick Scientific, Innova 40, Incubator shaker series*) ved 37 °C, 215 rpm i 15 minutter for å oppnå en homogen blanding med lik temperatur som vi har i kroppen. Etter 15 minutter ble 125 mg lakseolje tilsatt til hver av prøvene. Prøvene ble stående i varmeskapet ved 215 rpm over ulik tid, fra 0 til 80 minutter. Ved uttak av prøvene ble de satt direkte på is og umiddelbart tilsatt 15 mL kloroform:metanol (2:1) (begge fra *Merck*) blanding for å stoppe lipolysen av triglyserider.

Når alle reaksjonene var stanset ble intern standardene triheneicosanoic (Tri-C21, TG) og tricosanoic acid (C23, FFA) (begge fra *Larodan AB*) tilsatt med en mengde på hhv 500 og 200 µL (10 og 2 mg/mL) pr. prøve, og 5 % NaCl for å bedre fase-separasjonen. Intern standarden ble benyttet for å beregne mengde fettsyrer i de ulike fraksjonene. Ved interesse kun for de frie fettsyrene ble kun C23 tilsatt. Rørene ble ristet i 15 minutter ved 170 rpm på (*Biosan, Multi-shaker PSU 20*) før de ble sentrifugert i 15 minutter ved 2000 rpm på (*Thermo Electron Corporation, Heraeus Multifuge 4KR*). Etter sentrifugeringen ble det dannet ulike faser i rørene (se figur 3.6). Vi ønsker den nederste fasen som er kloroform fasen, som inneholder lipid og intern standarder. Fasen ble overført til 15 mL rør (*Kimax*) ved bruk av pasteurpipetter av glass. De nye rørene med kloroformfasen (organisk) ble tilsatt hver 1 mL destillert vann og sentrifugert i 5 minutter ved 1000 rpm (*Heraeus Sepatech, Minifuge RF*). Destillert vann ble tilsatt for å få rene prøver og å bli kvitt forurensninger som kan ha kommet med fra forrige faseoverføring. Kloroformfasen (nederst) ble overført til nye 15 mL rør. Prøvene ble inndampet vha. evapoator (*Stuart, Block heater SB130D/3, Sample concentrator SBHCONC/1*) og nitrogen ved 37 °C (~30 minutter).



**Figur 3.6:** Fasedannelse vist etter sentrifugering

Figuren til venstre viser *in vitro* fordøyelsesmodell med solbærpressrest som prøvemateriale, mens figuren til høyre inneholder rent plantestoff. Ønsket fase var blank og inneholdt klorofom, lipider og intern standard.

### 3.2.3.2 Fettsyre fraksjonering

Lipidfraksjon etter inndamping ble løst med 3,7 mL kloroform og hver prøve ble overført til spesielle glass tillaget SPE-robot (GERSTEL MultiPurpose Sampler MPS 2XL Twister).

Til fraksjonering av ulike lipidklasser ble som nevnt GERSTEL MultiPurpose Sampler MPS 2XL Twister og NH<sub>2</sub> FFE (fast faseekstraksjon) kolonner (Macherey-Nagel, Chromobond, 3 mL/200mg) benyttet. For fraksjonering av lipidklassene trengtes ulike løsemidler.

Kloroform:metanol 95:5 ble benyttet for å eluere triglyseridfraksjon, diethyleter:eddiksyre 99:1 til frie fettsyrer og metanol:kloroform 6:1 og metanol:kloroform 6:1 + 0,05 M NaHCO<sub>3</sub> til fosfolipider.

### 3.2.3.3 Metylering

Før fettsyrekomponentene i lipidene var klare til analyse på gasskromatografen var det nødvendig å derivatisere dem til lav molekylære upolare derivater, fettsyremetylestere (FAME). Fettsyremetylestere er fettsyrer som forestres med metanol. Slik forestring fører til økt flyktighet slik at fettsyrekomponentene kan separeres ved hjelp av gasskromatografi.

FFA og TG fraksjonene ble overført til nye 15 mL rør og prøvene ble dampet inn vha. nitrogen ved 37 °C. Fettet som ble liggende igjen i bunn av rørene ble reløst i 1 mL benzen (*Merck*) og rørene ble ristet. Det ble så tilsatt 3 mL 3N metanolisk HCl (*Supelco*) som en metyleringsreagens og 200 µL 2,2 dimethoxypropan (*Sigma-Aldrich*) for å binde opp de frigjorte glyserolene fra reaksjonsblandingen, slik at likevekten ble forskjøvet mot mer fullstendig derivatisering. Rørene ble ristet på nytt. For å oppnå en fullstendig derivatisering ble rørene satt til oppvarming i et 80 °C vannbad i 20 minutter. Prøvene ble så avkjølt før det ble tilsatt 1 mL isooktan (*Merck*) og 1 mL 5 % NaCl og sentrifugert ved 1000 rpm i 5 minutter. Etter sentrifugeringen dannet det seg et faseskille i rørene. Den øverste fasen, isooktan fasen, ble overført til nye rør og tilsatt 1 mL 2 % NaHCO<sub>3</sub> (*Merck*) for å nøytralisere overskuddet av HCl og vaske isooktanfasen. Rørene ble på nytt satt til sentrifugering ved 1000 rpm i 5 minutter. Isooktanlaget ble overført til GC-vials<sup>7</sup> og tilsatt en spatelspiss vannfri natriumsulfat, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (*Merck*) for å fjerne eventuelle vannrester i prøvene, før det ble festet lokk på glassene. Metoden er standard metode for derivatisering av fettsyrer ved *Nofima*.

### 3.2.3.4 Analyse av fettsyrer ved bruk av GC-FID

Analysen ble utført ved bruk av gasskromatograf (GC) med flammeionisasjonsdetektor (FID) detektor. Prøvene kan velges å kjøres ved split 50:1 eller splitless injeksjon avhengig av konsentrasjonen av fettsyrer i løsningen.

Splitless ble valgt for videre identifisering av frie fettsyrer, hvor all prøve føres inn på kolonnen. De opparbeidede prøvene ble injisert med en *Agilent HP 7673* injektor tilkoblet en *Agilent HP 6890* gasskromatograf. Prøvene ble separert på en *SGE BPX-70* kapillærkolonne (lengde = 60 m, diameter = 250 µm, filmtykkelse = 0,25 µm) med helium som bæregass. Temperaturprogrammet startet ved 70 °C i ett minutt og økte deretter med 30 °C hvert minutt til 170 °C, 1,5 °C i minuttet til 200 °C og 3,0 °C i minuttet til 220 °C. Deretter ble temperaturen holdt ved 220 °C i fem minutter. Arealene ble integrert med *Agilent GC ChemStation* software og identifisert ved sammenligning med en ekstern standardblanding, 68D (*Nu-Check Prep Inc*). Fordøyelse av lakseolje uten inhibitor, standardblanding og prøver med Orlistat ble kjørt under hver kjøring for å kalibrere og kontrollere systemet.

---

<sup>7</sup> GC-vial: Lite glass benyttet til GC med tilhørende krympekork

### 3.3 Tilsetting av ulike matkomponenter for å undersøke deres påvirkning på lipaseaktiviteten

For å studere om de ulike matkomponentene ville ha noen effekt på lipaseaktiviteten *in vitro* ble ulike mengder frysetørket brokkoli, brokkoliekstrakt, byggeekstrakt, solbærpressrest, fenoliske syrer og quercetin tilsatt.

Mengde prøvemateriale tilsatt til prøveoppsettet ble beregnet for hver enkelt komponent. Grunnlaget for mengder prøvemateriale ble tatt i henhold til tidligere publikasjoner (Karamac, M., *et al.*, 1996, Manach, C., *et al.*, 2004, Slanc, P., *et al.*, 2009) og studier ved *Nofima*. I de tilfeller hvor det ikke ble funnet noen publiserte resultater fra vitenskapelig forskning ble mengde prøvemateriale forsøkt testet uten noen bestemt pekepinn på hva som ville være reelt.

Når prøvematerialet ble tilsatt i væskeform, som for brokkoli ekstrakt, bygg ekstrakt, solbærpressrest, fenoliske syrer og quercetin, ble volum prøvemateriale byttet ut med samme volum destillert vann. Ble derimot prøvematerialet tilsatt i fast form, som for frysetørket brokkoli, ble ikke volumendringen tatt hensyn og 8,1 mL væske ble tilført. Se tabell 3.2 og 3.3 samt påfølgende kapitler (3.2.6.2 - 3.2.6.7) for tilsatte mengder plantematerialer og rene plantestoffer.

**Tabell 3.2:** Konsentrasjon av tilsatte mengder plantematerialer til *in vitro* fordøyelse

| <i>Prøvematerialer</i>      | <i>Konsentrasjon/mengde</i> |
|-----------------------------|-----------------------------|
| Frysetørket brokkoliknopper | 87,5 mg                     |
| Ekstraherte brokkoliknopper | 0,01 - 5,2 mg/mL            |
| Byggeekstrakt               | 0,65 - 34,0 mg/mL           |
| Solbærpressrestkonsentrat   | 237 – 1901 µg GAE/mL        |

**Tabell 3.3:** Konsentrasjon av tilsatte mengder rene plantestoffer til *in vitro* fordøyelse

| <i>Rene plantestoffer</i> | <i>Konsentrasjon, <math>\mu\text{M}</math></i> |
|---------------------------|--|
| Kaffesyre                 | 0,04 - 12,5                                    |
| Ferulsyre                 | 5,0 - 12,5                                     |
| Sinapinsyre               | 0,03 - 3,0                                     |
| Quercetin                 | 0,07 - 4,0                                     |

### 3.3.1.5 Frysetørket brokkolknopper

Et måltid jf. ”Det Sunne Måltid” inneholder 150 g brokkoli, mens 1/200 måltid inneholder 625 mg brokkoli. Rå brokkolknopper har et tørrstoffinnhold på ~14 %.

Tar man hensyn til tørrstoffinnholdet vil 87,5 mg frysetørket brokkoli utgjøre samme mengde. 87,5 mg frysetørket brokkoli ble veid inn direkte i 50 mL glassrøret (*Kimax*) samtidig som pankreatin og galle, og satt på kjøling til alle prøvene ble ferdig innveid og  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{NaCl}$  og destillert vann ble tilsatt til.

### 3.3.1.6 Ekstraherte brokkolknopper

Rå brokkolknopper har et tørrstoffinnhold på ~14 %. Dette tørrstoffinnholdet ble tatt hensyn til ved beregning av analyserte brokkolknoppkonsentrasjoner.

Ulike konsentrasjoner av ekstraherte brokkolknopper ble forsøkt testet fra 0,01 mg/mL til 5,20 mg/mL. Ekstraktet ble hentet fra  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ , tint og inndampet vha. nitrogen. Ekstraktet ble så reløst med samme mengde 20 % metanol som hva som ble inndampet. For å være sikker på at ekstraktet skulle reløses fullstendig ble det tilsatt først 100 % metanol, for deretter å tilsette destillert vann. Ekstraktet ble tilsatt direkte etter  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{NaCl}$  og mengde destillert vann ble justert i forhold til tilsatt mengde brokkolknoppstrakt. Som kontroll ble høyeste volum 20 % metanol tilsatt fordøyelse av lakseolje uten inhibitor.

### 3.3.1.7 Ekstrahert bygg

Rå byggryn har et tørrstoffinnhold på ~88 %. Dette tørrstoffinnholdet ble tatt hensyn til ved beregning av analyserte byggkonsentrasjoner.

Ulike konsentrasjoner av byggekstraktet ble forsøkt testet fra 0,65 mg/mL til 34,0 mg/mL.

Prosedyre for tilsetning av byggekstrakt er den samme som for *Ekstraherte brokkolikhopper* 3.2.6.2.

### 3.3.1.8 Solbærpressrestkonsentrat

Kunnskapen man hadde til solbærpressrestkonsentratet var innholdet av totale fenoliske komponenter, gitt ved gallesyreekvivalenter per mL (GAE/mL). Mengde solbærpressrestkonsentrat ble forsøkt testet i området fra 237 – 1901 µg GAE/mL (250 µL til 2000 µL) for å se om mulig doserespons. Pressrestkonsentratet ble tilsatt i bestemt mengde direkte etter 0,15 M PBS og mengde destillert vann justert i forhold til tilsatt mengde konsentrat.

### 3.3.1.9 Fenoliske syrer

Mengder fenoliske syrer som ble tilsatt i prøveoppsettet ble bestemt ut i fra tidligere forskning ved *Nofima*. Konsentrasjoner kaffesyre som ble testet var fra 0,04µM – 12,5 µM, ferulsyre fra 5,0 µM – 12,5 µM, mens sinapinsyre kun ble testet ved 0,03 µM – 3,0 µM.

Løsningene ble tilsatt direkte etter 0,15 M PBS og mengde destillert vann ble justert i forhold til tilsatt mengde løsning med fenoliske syrer. Som kontroll ble høyeste volum av hhv 20 og 70 % metanol tilsatt en fordøyelse av lakseolje uten fenolisk syre.

### 3.3.1.10 Flavonol

0,07 µM – 4,0 µM quercetin ble tilsatt i fordøyelsesmodellen. Det tilsvarte 192 og 496 µL av de to tillagde løsningene med hhv. 100 og 20 % metanol. Quercetinløsningen ble tilsatt direkte etter NaHCO<sub>3</sub> og NaCl, og mengde destillert vann ble justert i forhold til tilsatt mengde flavonol. Som kontroll ble høyeste volum av hhv 20 og 100 % metanol tilsatt en fordøyelse av lakseolje uten flavonol.

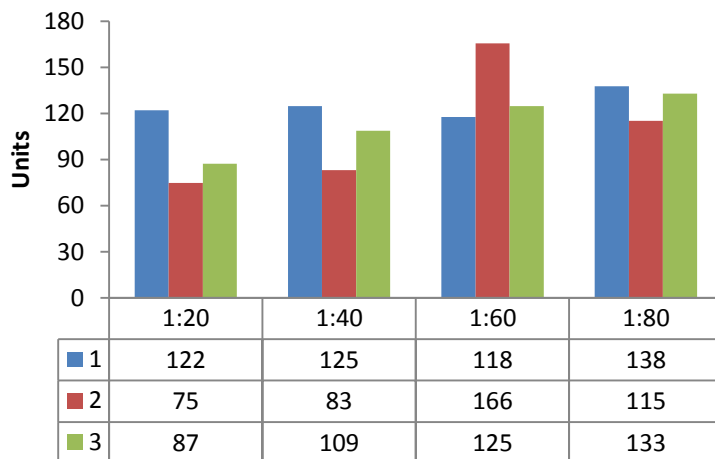


## 4 Resultat

### 4.1 Uttesting og modifisering av metoder for bestemmelse av pankreatisk lipase aktivitet

#### 4.1.1 Kolorimetrisk *in vitro* assay for bestemmelse av lipaseaktivitet

Det ble testet ut en *in vitro* analyse for bestemmelse av lipaseaktivitet ved kolorimetrisk analyse. Metoden som ble benyttet var 'Cobas Lipase colorimetric assay', og er en veletablert metode for å måle lipaseaktiviteten i human magesaft. Imidlertid viste det seg tidlig i dette studiet at metoden benyttet på kommersiell galle og pankreatin ga opp mot 40 % variasjon i resultatene. Figur 4.1 viser typiske analyseresultater av lipaseaktiviteten, angitt som 'units' ved ulike fortyninger av pankreatin- og galleløsning i tre analysegjentak.



**Figur 4.1:** Lipaseaktivitet målt kolorimetrisk ved ulike fortyninger av pankreatin og galle i tre analysegjentak (1-3)

Resultatene i figur 4.1 viser at den kolorimetriske analysemetoden ikke gir reproducerbare resultater. Det ble derfor bestemt at en annen analysemetode måtte testes ut og benyttes til studier av lipaseaktivitet.

#### 4.1.2 Modifisering og optimalisering av Aura-modellen

Aura-modellen er utviklet som en *in vitro* enzymatisk fordøyelse med kommersielle enzymer for hydrolyse av stivelse og protein. Aura-modellen ble i denne oppgaven testet ut, modifisert og optimalisert, med fokus på pankreatisk lipaseaktivitet og hydrolyse av lipider i fiskeolje. Dette kapittelet beskriver resultatene som ble oppnådd ved uttesting av de ulike komponentene som kan påvirke *in vitro* lipidfordøyelse: type lipid og mengde substrat, volum, pH, inkubasjonstid og andre komponenter som må være tilstede for å oppnå tilnærmede fysiologiske forhold *in vivo*.

##### 4.1.2.11 Type og mengde substrat

Type lipid: Fremstilt olje fra laks (Denomega).

Mengde lipidsubstrat: 125 mg substrat.

##### 4.1.2.12 Volum

Totalvolumet i assayet var på 28,7 mL i de første forsøkene, et volum som tok utgangspunkt i totalvolumet benyttet i Aura-modellen. Lavere totalvolum ble testet ut i området 2,7-28,7 mL, for å finne et volum som ville gi høyest frigjøring av frie fettsyrer. Ved nedskalering av totalvolum ble mengde enzymer, gallsalter, og andre komponenter nedskalert tilsvarende slik at konsentrasjonen var de samme, mens mengde substrat ble holdt konstant ved 125 mg. Det ble funnet at det var mulig å redusere inkubasjonsvolumet nesten fire ganger, og det ble ut i fra dette besluttet å benytte et volum på 8,1 mL.

##### 4.1.2.13 pH

Pankreatisk lipase er aktiv ved pH ~7, pH ble derfor alltid holdt innen et område på  $\pm 0,3$ . Ved analyse av det sure solbærpressrestkonsentratet, ble natriumkarbonat og natriumklorid, byttet med 0,15 M PBS, på grunn av PBS sin bufferkapasitet ved pH 7. Det ble derimot ikke påvist noen ulikheter i analyseresultatene ved benyttelse av PBS, sett i forhold til natriumkarbonat og natriumklorid. PBS ble allikevel valgt å benytte videre i studiene, da dette krevde mindre arbeid med pH justering.

### 4.1.2.14 Inkubasjonstid

For å bestemme optimal inkubasjonstid *in vitro* ble effekten av pankreatisk lipase målt ved frigjøring av frie fettsyrer i tidsintervallet 0 til 140 minutter, i samarbeid med doktorgradsstipendiat Kristi Ekran Aarak. Resultatene vil bli en del av hennes doktorgrad og derfor publisert ved senere tidspunkt. Det viser seg å være eksponentiell aktivitet av pankreatisk lipase og frigjøring av frie fettsyrer, og optimal inkubasjonstid ser ut til å vil være 80 minutter, da kurven flater ut etter dette. For å lage en kontroll uten lipasehemming ble metoden optimalisert og basert på kun fordøyelse av lakseolje. Resultatet av disse kjøringene (n=14) ga en gjennomsnittsverdi på  $164,2 \pm 9,2$  mg FFA/g lakseolje ved 80 minutter. Det er dette gjennomsnittet som ble benyttet videre for å studere inhibitorisk effekt av Orlistat, ulike plantematerialer og rene plantestoffer.

### 4.1.2.15 Sammensetning i lipaseassayet

Ved videre benyttelse av det nye totalvolumet, på 8,1 mL, ble det benyttet: 71,21 mg galle, 1,13 mL natriumbikarbonat, 2,43 mL natriumklorid, 4,54 mL destillert vann og 9,72 mg pankreatisk lipase (se tabell 3.1). Substratkonsentrasjonen ble derimot holdt konstant ved 125 mg, da det var ønskelig å få maks frigjøring av frie fettsyrer.

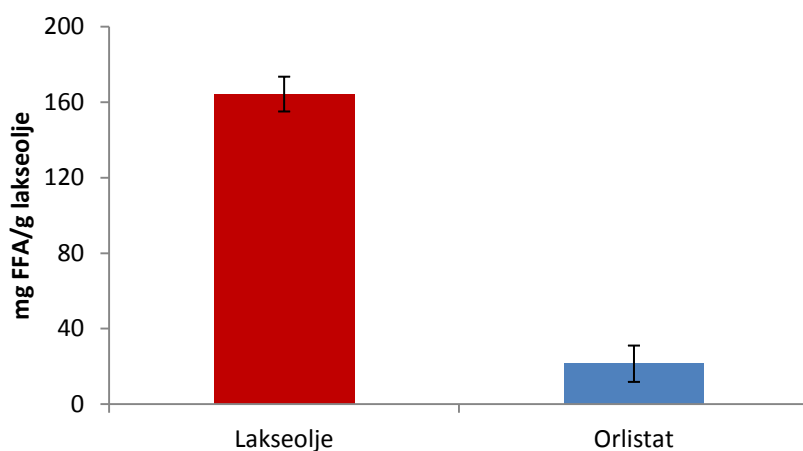
## 4.2 Inhibitoriske effekter på pankreatisk lipase

Plantematerialer og rene plantestoffer ble analysert for å se mulig inhibitorisk effekt på pankreatisk lipase *in vitro*. De ulike plantematerialene og plantestoffene viste seg å ha ulike innvirkning på lipaseaktiviteten, hvor noen ikke viste noe inhibering, viste noen litt, mens andre viste seg å være spesielt gode inhibitorer. I dette kapitlet vil derfor effekten av de ulike plantematerialene og rene plantestoffene bli fremstilt, sammen med lipasehemmeren Orlistat.

### 4.2.1 Orlistat som lipasehemmer

Det var ønskelig å studere legemiddelet Orlistat og lipaseaktiviteten *in vitro* for å kartlegge om Orlistat kunne benyttes som positiv kontroll for videre analyser. Ulike mengder Orlistat ble analysert, men for å studere den reelle inhibitoriske evnen til Orlistat ble mengden nedskalert 200 ganger, tilsvarende det nedskalerte måltidet. Analyseresultatene vist i figur 4.2,

viser frigjøring av frie fettsyrer, ved fordøyelse av lakseolje med Orlistat og fordøyelse av lakseolje uten inhibitor (kontroll), etter 80 minutter.



**Figur 4.2:** Effekt av Orlistat på pankreatisk lipase

Verdiene i figur 4.2 er gitt som gjennomsnittsverdier av 14 analyser med  $\pm$ standard avvik. Resultatene viser at Orlistat reduserer lipaseaktiviteten  $86,9 \pm 6,3$  % sammenlignet med fordøyelse av lakseolje uten inhibitor tilstede. Orlistat viste seg å være en god lipasehemmer og ble benyttet som positiv kontroll ved samtlige analyser utført på et senere tidspunkt.

#### 4.2.2 Plantematerialer som lipasehemmere

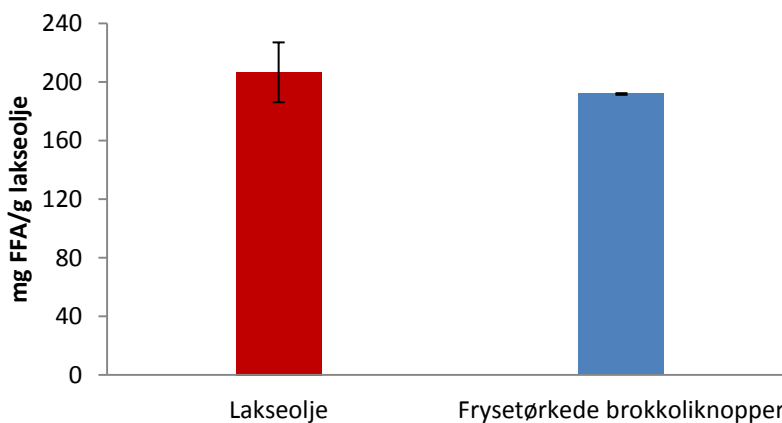
Bygg, brokkoli og solbær er tre plantematerialer som inneholder ulike fenoliske komponenter, i ulike mengder. Fotometrisk analyser ble utført i samarbeid med mastergradsstudent Silje Johansen for å måle innholdet totale fenoler og antioksidantkapasitet i hele byggryn fra Sjøk Mølle. Hun har som en del av sin oppgave funnet innholdet totale frie fenoler til å være  $324 \pm 14$  mg GAE/100 g tørrvekt og totale bundne fenoler til å være  $297 \pm 5,28$ . Antioksidantkapasiteten ble funnet til å være  $3,9 \pm 0,1$  mmol Fe/100 g tørrvekt. Innholdet av flavonolet quercetin i brokkoliknopper ble bestemt ved bruk av HPLC, og funnet å være  $138 \pm 13,3$  mg/kg ferskvekt (analysert av mastergradsstudent Silje Johansen). Innholdet totale fenoler i solbærpressrestkonsentratet ble oppgitt til å være ca. 7,7 mg GAE/mL (analysert av doktorgradsstipendiat Linda Holtung).

## RESULTAT

### 4.2.2.16 Frysetørkede brokkoliknopper

Brokkoliknopper ble frysetørket og vekten ble målt etter frysetørkingen. Tørrvekt ble beregnet til å være ~14 % og 87,5 mg frysetørkede brokkoliknopper ble benyttet for å studere lipaseaktiviteten. Analyseresultatene vist i figur 4.3, viser frigjøring av frie fettsyrer, ved tilsatt frysetørkede brokkoliknopper og fordøyelse av lakseolje uten inhibitor (kontroll), etter 80 minutter.

For å gi en reell fremstilling av disse resultatene ble verdiene for frigjøring av frie fettsyrer ved fordøyelse av lakseolje uten inhibitor for denne separate analysen benyttet, da frigjøringen av frie fettsyrer for denne analysen viste seg å være relativt høyere enn beregnet gjennomsnitt.

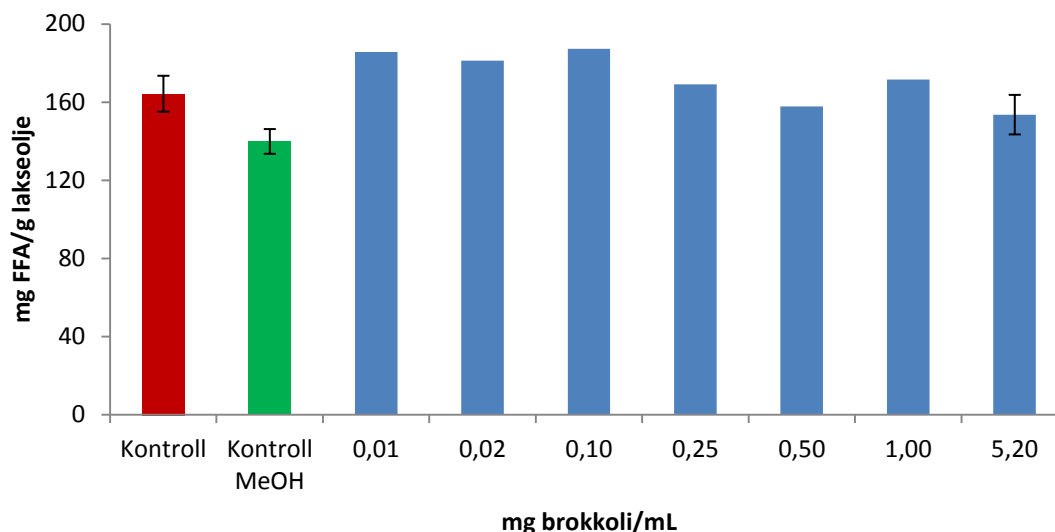


**Figur 4.3:** Inhibering av pankreatisk lipase med frysetørket brokkoliknopper

Frysetørkede brokkoliknopper ble analysert én gang med tre parallelle kjøringar og verdiene er gitt som gjennomsnittsverdier med  $\pm$  standard avvik. Figur 4.3 viser at det ikke ble funnet noen, eller liten inhibitorisk effekt av frysetørket brokkoliknopper ved mengden benyttet i denne studien.

### 4.2.2.17 Brokkoliekstrakt

Et brokkoliekstrakt ble laget ved metanolekstraksjon, og ekstraktet ble benyttet til å bestemme lipaseaktiviteten *in vitro*. Analyseresultatene vist i figur 4.4, viser frigjøring av frie fettsyrer ved økende konsentrasjoner brokkoliekstrakt, fordøyelse av lakseolje uten inhibitor (kontroll) og fordøyelse av lakseolje med tilsatt høyeste mengde 20 % metanol benyttet fra ekstraktet (kontroll MeOH), etter 80 minutter.



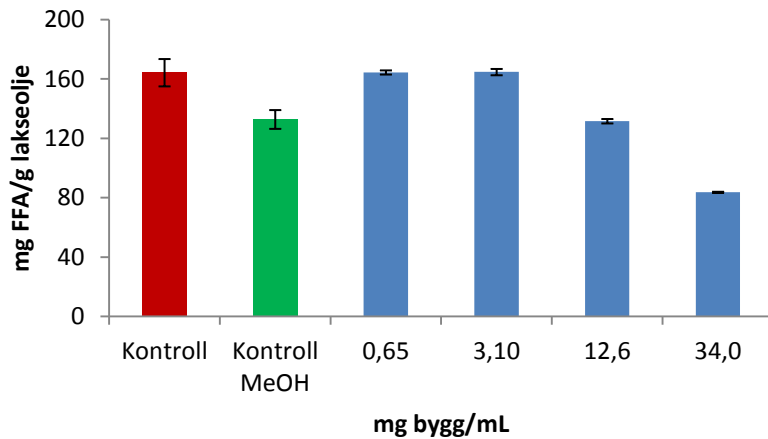
**Figur 4.4:** Effekt av brokkoliekstrakt på pankreatisk lipase

Prøver med brokkoliekstrakt i konsentrasjonsområdet 0,01 – 1,00 mg/mL ble analysert én gang, mens den høyeste konsentrasjonen på 5,20 mg/mL ble analysert to ganger og gitt som gjennomsnittsverdi med  $\pm$  standard avvik. Som figur 4.4 viser, ble det ikke observert noen inhibering av pankreatisk lipase med de benyttede konsentrasjonene brokkoliekstrakt.

#### 4.2.2.18 Byggeekstrakt

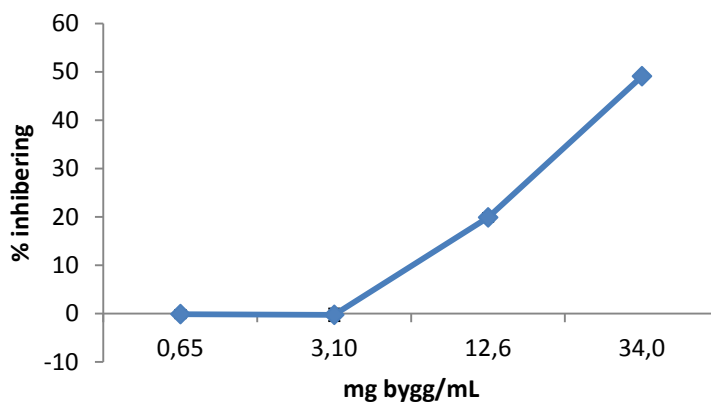
Et byggeekstrakt ble laget ved metanolekstraksjon, og analyser for bestemmelse av lipaseaktiviteten *in vitro* ved tilstedeværelse av byggeekstrakt ble utført. Analyseresultatene vist i figur 4.5 viser frigjøring av frie fettsyrer ved økende konsentrasjoner byggeekstrakt, fordøyelse av lakseolje uten inhibitor (kontroll) og fordøyelse av lakseolje med tilsatt høyeste mengde 20 % metanol benyttet fra ekstraktet (kontroll MeOH), etter 80 minutter.

## RESULTAT

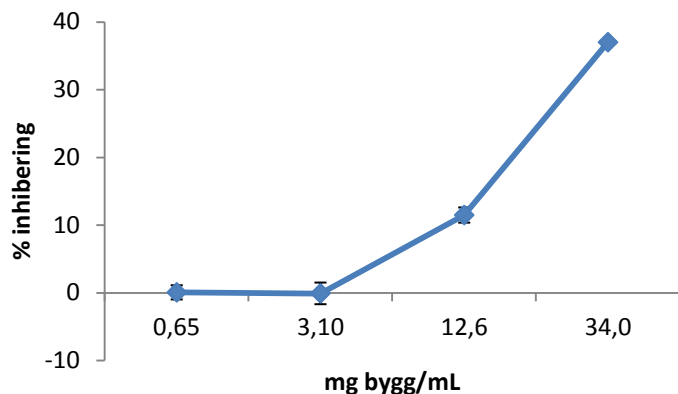


**Figur 4.5:** Effekt av byggekstrakt på pankreatisk lipase. Verdiene er gitt som gjennomsnittsverdier av to gjentak med  $\pm$  standard avvik

Som man kan se fra figur 4.5 kan det først måles inhiberende aktivitet ved doseringer på 12,3 - 34,0 mg bygg/mL. Sammenlignet med fordøyelse av lakseolje uten inhibitor, utgjør dette  $19,9 \pm 0,91$  og  $49,1 \pm 0,24$  % hemming av lipaseaktiviteten ved hhv 12,6 og 34,0 mg bygg/mL (se figur 4.6). Figur 4.7 viser de samme resultatene, men her ble inhiberingen av 20 % metanol ved de ulike volumene tatt hensyn til.



**Figur 4.6:** Inhibering av pankreatisk lipase med byggekstrakt, gitt som prosent. Verdiene er gitt som gjennomsnittsverdier av to gjentak med  $\pm$  standard avvik

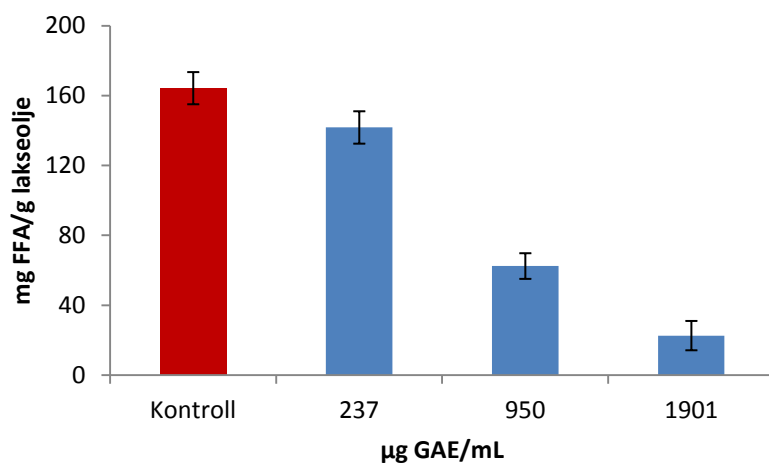


**Figur 4.7:** Inhibering av pankreatisk lipase med byggekstrakt, korrigert for % inhibering av benyttede volum 20 % metanol. Verdiene er gitt som gjennomsnittsverdier av to gjentak med  $\pm$  standard avvik

Figur 4.7 viser at inhibering av pankreatisk lipase, korrigert for mulig inhibering av 20 % metanol, ble  $11,5 \pm 1,12$  og  $37,0 \pm 0,30$  % ved hhv 12,6 og 34,0 mg bygg/mL.

#### 4.2.2.19 Solbærpressrestkonsentrat

Et solbærpressrestkonsentrat ble analysert for å se mulig inhibitorisk effekt på pankreatisk lipase *in vitro*. Stigende mengder solbærpressrestkonsentrat ble analysert for å undersøke doserespons. Analyseresultatene er vist i figur 4.8.

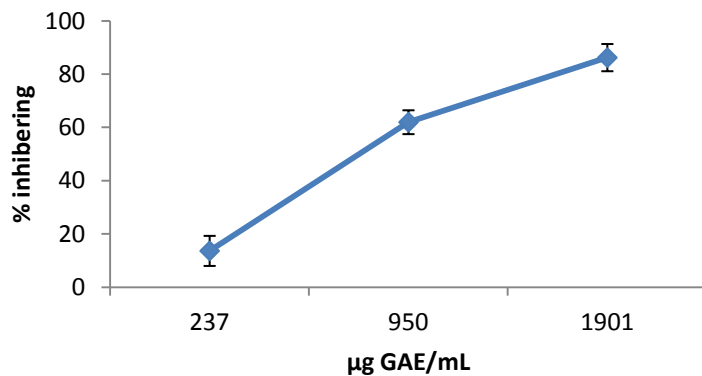


**Figur 4.8:** Effekt av solbærpressrestkonsentrat på pankreatisk lipase. Tallene er gitt som gjennomsnittsverdier av tre gjentak med  $\pm$  standard avvik



## RESULTAT

Figur 4.8 viser frigjøringen av frie fettsyrer ved *in vitro* fordøyelse etter 80 minutter hvor det ble benyttet økende mengder solbærpressrest og kontroll med fordøyelse av lakseolje uten inhibitor. Resultatene viser at solbærpressrestkonsentratet hadde høy inhibering og nesten en lineær dose respons. Allerede fra 0,25 mL solbærpressrestkonsentrat var det mulig å se inhibering av lipasen. Resultatene beregnet i prosent er vist i figur 4.9.



**Figur 4.9:** Inhibering av pankreatisk lipase med solbærpressrestkonsentrat, oppgitt i prosent. Tallene er gitt som gjennomsnittsverdier av tre gjentak med  $\pm$  standard avvik

Resultatene er gitt som gjennomsnittsverdier av tre gjentak med  $\pm$  standardavvik. Resultatene viser respektivt 13,7 $\pm$ 5,6 %, 62,0 $\pm$ 4,5 % og 86,2 $\pm$ 5,1 % hemming av lipaseaktiviteten ved økende konsentrasjon solbærpressrestkonsentrat.

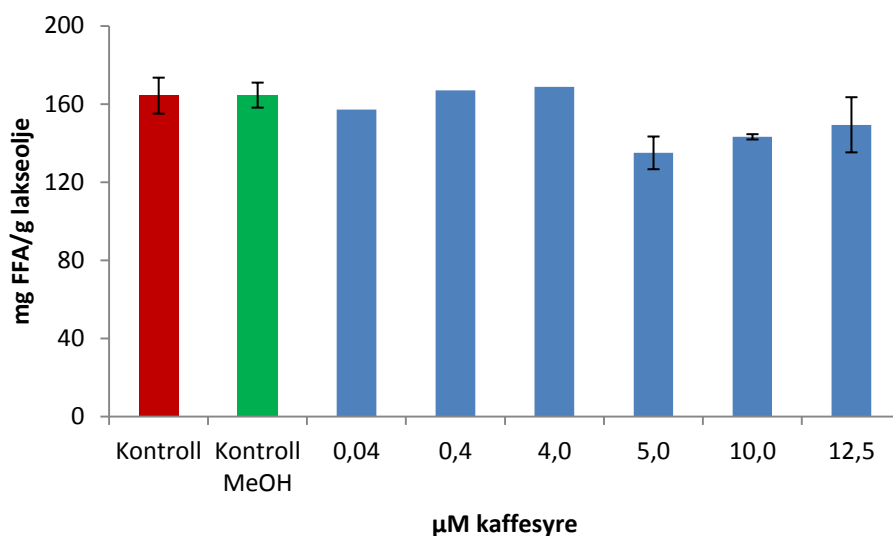
### 4.2.3 Rene plantestoffer som lipasehemmere

Innholdet av plantestoffer i bygg ble som nevnt tidligere (se 4.2.2) analysert i samarbeid med mastergradsstudent Silje Johansen, mens hun alene var ansvarlig for analyser av innholdsstoffer i brokkoli. Med kunnskap om hvilke plantestoffer som finnes i plantematerialene, var det av interesse å studere om rene plantestoffer, som fenoliske syrer og quercetin, funnet i plantematerialene, ville gi inhibering av lipaseaktiviteten *in vitro*. De fenoliske syrene og flavonolet quercetin presenteres i dette kapitlet hver for seg.

#### 4.2.3.20 Kaffesyre

Kaffesyre, løst i en 20 % metanol løsning, ble analysert i økende konsentrasjoner fra 0,04 til 12,5  $\mu\text{M}$  for å studere om den fenoliske syren ville ha påvirkning på lipaseaktiviteten.

Analyseresultatene vist i figur 4.10, viser frigjøring av frie fettsyrer ved *in vitro* fordøyelse, fordøyelse av lakseolje uten inhibitor (kontroll) og kontroll med metanol tilsvarende den høyeste konsentrasjonen tilsatt i prøvene (Kontroll MeOH), etter 80 minutter.



**Figur 4.10:** Effekt av kaffesyre på pankreatisk lipase

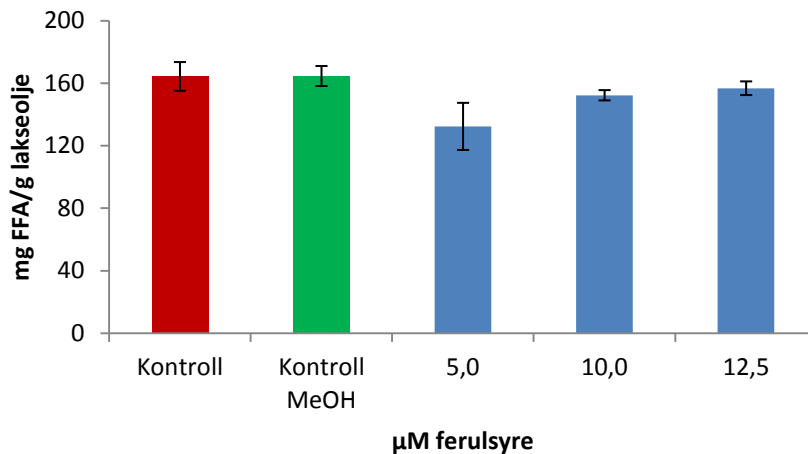
Prøver med kaffesyre i konsentrasjonsområdet 0,04 – 4,0  $\mu\text{M}$  ble analysert én gang, mens konsentrasjonene 5,0 – 12,5  $\mu\text{M}$  ble analysert to ganger og gitt som gjennomsnittsverdier med  $\pm$  standard avvik. Konsentrasjonene 0,04 – 4,0  $\mu\text{M}$  ble som nevnt tidligere kun analysert én gang og som figur 4.10 viser, ble ingen inhibering observert ved disse konsentrasjonene.

Konsentrasjonene 5,0 – 12,5  $\mu\text{M}$  ble analysert, med to gjentak. Resultatene av disse konsentrasjonene ser derimot ut til å redusere lipaseaktiviteten noe med størst inhibering med 5,0  $\mu\text{M}$  kaffesyre, en inhibering på hhv  $17,8 \pm 5,1$  %, mens 10  $\mu\text{M}$  og 12,5  $\mu\text{M}$  ga en inhibering på hhv  $12,8 \pm 0,83$  % og  $9,1 \pm 8,6$  % (se figur 4.12).

## RESULTAT

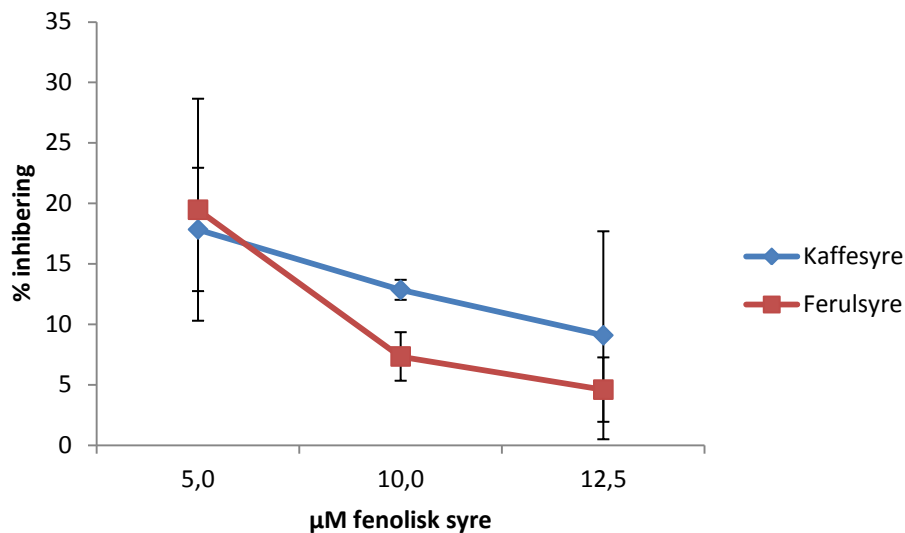
### 4.2.3.21 Ferulsyre

For å studere om den fenoliske syren ferulsyre ville ha påvirkning på lipaseaktiviteten, ble ferulsyre tilsatt lipaseassayet i økende konsentrasjoner fra 5,0 til 12,5  $\mu\text{M}$ , løst i 20 % metanol. Analyseresultatene i figur 4.11, viser frigjøring av frie fettsyrer under *in vitro* fordøyelse, fordøyelse av lakseolje uten inhibitor (kontroll) og kontroll med metanol tilsvarende den høyeste konsentrasjonen tilsatt i prøvene (Kontroll MeOH), etter 80 minutter.



Figur 4.11: Effekt av ferulsyre på pankreatisk lipase. Resultatene er gitt som gjennomsnittsverdier av to gjentak med  $\pm$  standard avvik

Resultatene i figur 4.11 viser at de benyttede konsentrasjonene av ferulsyre reduserer lipaseaktiviteten noe, der 5  $\mu\text{M}$  ferulsyre ga  $19,5 \pm 9,2$  % inhibering av lipaseaktiviteten, mens 10  $\mu\text{M}$  og 12,5  $\mu\text{M}$  ga hhv  $7,3 \pm 2,0$  % og  $4,6 \pm 2,7$  % inhibering. Disse resultatene kan sees i figur 4.12, sammen med kaffesyre.

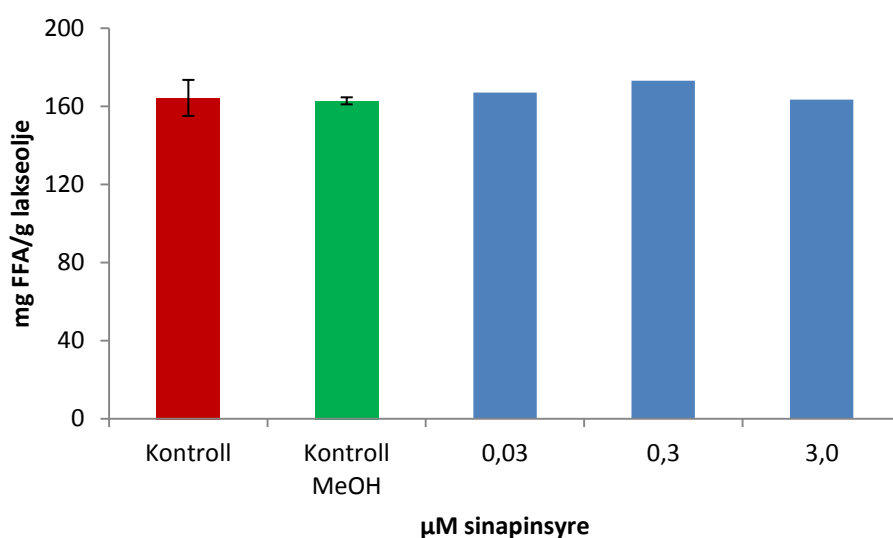


**Figur 4.12:** Inhibering av pankreatisk lipase med kaffesyre og ferulsyre, oppgitt i prosent

#### 4.2.3.22 Sinapinsyre

For å studere om sinapinsyre hadde påvirkning på lipaseaktiviteten, ble den tilsatt lipaseassayet i økende konsentrasjoner fra 0,03 til 3,0 μM, løst i 70 % metanol.

Analyseresultatene vist i figur 4.13, viser frigjøring av frie fettsyrer ved *in vitro* fordøyelse, fordøyelse av lakseolje uten inhibitor (kontroll) og kontroll med metanol tilsvarende den høyeste konsentrasjonen tilsatt i prøvene (Kontroll MeOH), etter 80 minutter.



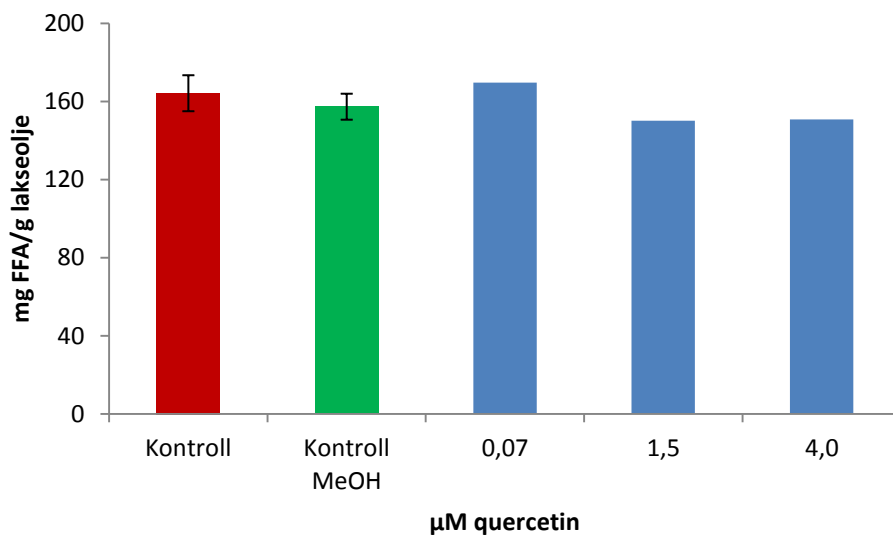
**Figur 4.13:** Effekt av sinapinsyre på pankreatisk lipase

## RESULTAT

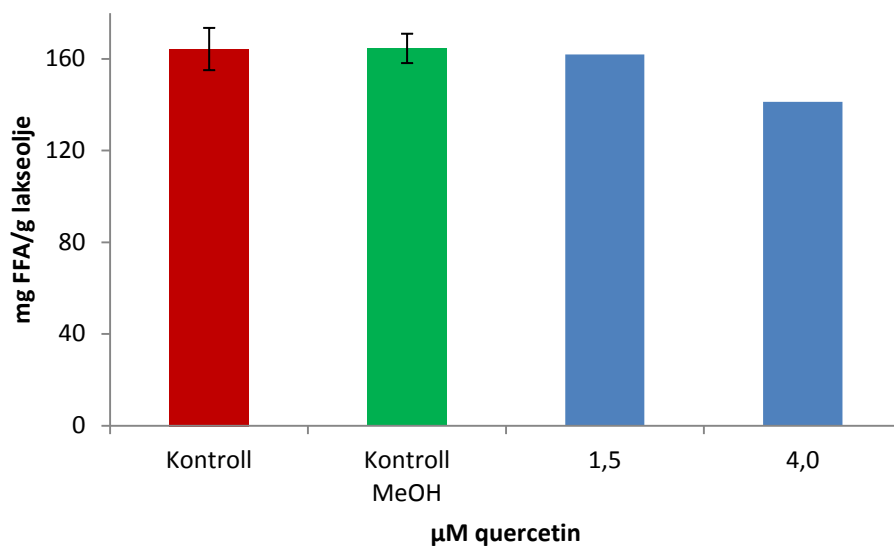
Som figur 4.13 viser, ble det ikke observert noen inhibitorisk effekt på pankreatisk lipase i denne studien, ved de benyttede konsentrasjonene.

### 4.2.3.23 Quercetin

For å studere om flavonolet quercetin ville ha påvirkning på lipaseaktiviteten, ble quercetin tilsatt lipaseassayet i økende konsentrasjoner fra 0,07 til 4,0  $\mu\text{M}$ , løst i 20 % metanol og 1,5 og 4,0  $\mu\text{M}$  løst i 100 % metanol. Analyseresultatene i figur 4.14 og 4.15 viser frigjøring av frie fettsyrer ved *in vitro* fordøyelse, fordøyelse av lakseolje uten inhibitor (kontroll) og kontroll med metanol tilsvarende den høyeste konsentrasjonen tilsatt i prøvene (Kontroll MeOH), etter 80 minutter.



**Figur 4.14:** Effekt av quercetin (løst i 100 % metanol) på pankreatisk lipase



**Figur 4.15:** Effekt av quercetin (løst i 20 % metanol) på pankreatisk lipase

Figur 4.14 og 4.15 viste at analysene med quercetin ikke viste noe inhibering av pankreatisk lipase ved de benyttede konsentrasjonene.

## 5 Diskusjon

### 5.1 Uttesting og modifisering av metoder for bestemmelse av pankreatisk lipase aktivitet

Det finnes en rekke *in vitro* fordøyelsesmodeller som tar for seg ulike deler av fordøyelsessystemet og simulerer de fysiologiske forholdene på varierende måter, man er derfor avhengig av å benytte en metode som er direkte egnet for det man ønsker å studere. Enzymaktivitet av pankreatisk lipase har blitt målt ved bruk av forskjellige metoder i ulike studier, og resultatene varierer i henhold til ulike faktorer som, gallesalter, ko-lipase, substrat, pH, temperatur, inkubasjonstid, fordøyelseshastighet og deteksjonsmetode. En direkte sammenligning mellom ulike studier er derfor vanskelig. For å undersøke aktiviteten av pankreatisk lipase og studere den mulig hemmende effekten av plantematerialer og rene plantestoffer, ble det testet ut to ganske ulike *in vitro* analysemetoder i denne oppgaven.

Kolorimetrisk lipase assay er en metode for å bestemme lipaseaktiviteten *in vitro*. I oppgaven ble det valgt å først teste ut et slikt assay, 'Cobas Lipase colorimetric assay'. Metoden ble valgt da den ble ansett for å være en rask metode, hvor analysene kunne utføres på et automatisert instrument, med gode muligheter til å teste ut et stort antall prøver på kort tid. Dette assayet var tidligere blitt benyttet av Ulleberg, E.K., *et al.*, 2011 for å studere lipaseaktiviteten i human magesaft. I denne oppgaven ble det testet om human magesaft kunne erstattes med kommersiell galle og pankreatin, men resultatene viste at det i gjentakende forsøk ble for stor spredning i analyseparallelene og dårlig reproducerbare resultater. Doktorgradsstipendiat Kristi Ekrann Aarak utførte analyser kun med pankreatisk lipase, for å undersøke om det var tilsetningen av gallesalter som ga den dårlige reproducerbarheten, men dette viste seg å ikke være tilfelle. Det var heller ikke noe mulig forklaring å spore når ulike gallesaltkonsentrasjoner ble tilsatt. Uansett mengde var det stor spredning i analyseparallelene.

Ettersom den modifiserte Cobas-metoden ga problemer som vi ikke fant en løsning på, ville usikkerheten ved inhiberingsstudier bli stor, da en mulig feilkilde allerede kunne ligge i analysemetoden. Derfor ble det tidlig bestemt at en annen modell måtte benyttes.

En modell hovedsakelig komponert for enzymatisk hydrolyse av fordøyelig stivelse og proteiner, Aura-modellen, ble valgt å testes, utvikles og optimaliseres. Dette var en fordøyelsesmodell som stipendiat Kristi Ekrann Aarak også benyttet i sine studier av fordøyelse av laks og lakseolje, og det ble et samarbeid mellom oss to på den utførte metodeutviklingen. I forhold til mange andre modeller, som ofte er forenklete systemer, ble den utviklede modellen relativt fysiologisk lik lipasereaksjonene i kroppen. De ulike faktorene som er med på å bestemme de fysiologiske forholdene diskuteres fortløpende.

Enzymene krever ofte tilstedeværelse av andre komponenter for å aktiviseres, for eksempel krever pankreatisk lipase tilstedeværelse av ko-lipase og gallesalter (Boisen, S., *et al.*, 1991). Ko-lipase og gallesalter ble tilsatt inkubasjonsblandingen som hhv pankreatin fra pankreas hos svin og en gallesalt- blanding fra storfe og sau. En faktor som var viktig å vurdere var mengde gallesalter som skulle benyttes. Da man vet duodenum inneholder 5-15 mM gallesalter etter inntak av et måltid, bør gallesaltinnhold holdes et sted i dette intervallet. Ved høye gallesaltkonsentrasjoner er det fare for at gallesaltene inhiberer lipasen i stedet for å aktivere den, ved at de danner miceller før lipasen får brutt ned fett til frie fettsyrer som kan tas opp i tarmen. I samarbeid med Kristi Ekrann Aarak ble det utført analyser på ulike konsentrasjoner gallesalter som en del av hennes doktorgrad, for å studere effekten av ulike konsentrasjoner. Etter disse studiene ble det valgt å benytte en gallesaltkonsentrasjon på 11,8 mM, et innhold som ligger innenfor de fysiologiske forholdene (McClements, D. J. *et al.*, 2010).

Det blir også i litteraturen vist til at kalsium må være tilstede for at pankreatisk lipase skal aktiveres (Boisen, S., *et al.*, 1991). Ulike *in vitro* fordøyelsesmodeller oppnår, som nevnt tidligere, en tilnærming til de fysiologiske forholdene *in vivo* på ulike måter, og ikke alle *in vitro* modeller tilsetter kalsium. Aura-modellen, som ble benyttet i denne oppgaven, hadde i utgangspunktet ikke kalsium i inkubasjonsblandingen. Pågående studier av doktorgradsstipendiat Kristi Ekrann Aarak har testet effekter av kalsium, og resultater så langt indikerer at mineralet ikke har en effekt på fettsyrehydrolysen.

I en *in vitro* fordøyelsesmodell der formålet er å studere aktiviteten av pankreatisk lipase, kan ulike lipidsubstrater benyttes som simulator for fett i maten. Lakseolje ble benyttet som substrat i denne oppgaven, da lakseolje er et reelt substrat for pankreatisk lipase i *in vivo*



## DISKUSJON

fordøyelse. Det ble ikke testet ut andre substrater i denne oppgaven da lakseoljen ga reproduserbare og fine resultater. Og fettsyreprofil etter fordøyelse var som forventet fra denne oljen. Utgangspunktet for å velge 125 mg lakseolje i lipase assayet var mengde fett i et 180 g rått laksestykk, som så ble nedskalert for at den skulle være tilpasset analyser på GC. Et annet viktig poeng var forholdet enzym:substrat. Mengden substrat må alltid være i overskudd, da enzymaktiviteten avhenger av mengde substrat. Hydrolysen av fett vil øke proporsjonalt med mengde substrat og enzym helt til hydrolysen stagnerer og maks enzymhastighet er oppnådd. Ulike substrat mengder ble ikke analysert, mengden ble i stedet holdt konstant ved 125 mg.

pH varierer i de ulike stadiene i fordøyelsen. Optimalt pH-område for pankreatisk lipase er pH 8,5, men enzymet fungerer også godt ved nøytral pH (pH 7) (McClements, D. J. *et al.*, 2010). Det ble valgt å holde pH 7 i dette studiet da dette er benyttet i Aura-modellen. Det aller viktigste ble å holde pH stabil gjennom de ulike analysene, slik at lipasen ville ha de samme forholdene under hver analyse. Dette var en av grunnene til at en PBS buffer med god bufferkapasitet ble testet ut da sure solbærekstrakter ble studert.

Ulike fordøyelsesmodeller benytter seg av ulike inkuberingstider. Ingen vitenskapelige studier er publisert der *in vitro* pankreatisk lipaseaktivitet som FFA frigjøring har vært målt ved gasskromatografi. Derfor måtte ulike inkubasjonstider studeres. Aura-modellen benytter en inkubasjonstid på tre timer for fordøyelse i duodenum og jejunum, mens ulike modeller og assays benytter seg av ulike inkubasjonstider. 'Cobas Lipase colorimetric assay', benytter derimot kun 5-6 minutter på å bestemme lipaseaktiviteten. I denne oppgaven ble lipaseaktiviteten studert i tidsintervallet 0-140 minutter, og det ble observert en økende mengde frigjøring av fettsyrer over tid opp til 80 minutter, der mengden frie fettsyrer var høyest. Denne inkubasjonstiden ble derfor benyttet i videre analyser.

Volum på fordøyelsesblandingen er en av faktorene som er svært ulik fra forskjellige fordøyelsesmodeller. I denne oppgaven ble det funnet at et totalvolum på 8,1 mL var optimalt, da dette volumet var relativt lik de fysiologiske forholdene *in vivo*, og ga høyest utbytte av frie fettsyrer. Et slikt volum vil være mye bedre tilnærming til de fysiologiske forholdene *in vivo*, enn hva enklere lipase assays vil være. Substrat og plantematerialene ble nedskalert 200 ganger i forhold til mengde matvarer inntatt ved et måltid, jfr. "Det Sunne Måltid". På samme

måte tenker man at totalvolumet er nedskalert 200 ganger, noe som tilsier at totalvolumet vil være 1,62 liter uten nedskaleringen. *In vivo* vil det sekreteres opp mot 2 liter galle og bukspytt i tynntarmen hver dag (Pedersen, J.I., *et al.*, 2009). Dette tilsier at *in vitro* volumet i modellen vil være forholdsvis lik *in vivo* volum. Hvis man tenker at fire måltider inntas daglig, vil dette utgjøre ca 0,4 og 0,5 liter sekret per måltid.

Da modellen var ferdigutviklet og de ulike faktorene testet, var fordøyelse av ren lakseolje i den så langt optimaliserte modellen kontrollen for de videre studiene av inhibitorer. For å bestemme lipaseaktiviteten ble frigjøringen av frie fettsyrer analysert. En lakseolje inneholder ulike lipidklasser, og disse ble først fraksjonert ved hjelp av fastfase ekstraksjon. En fast fase ekstraksjon kan utføres manuelt eller vha av et robotisert instrument. Instrumentet Gerstel MultiPurpose Sampler MPS 2XL Twister ble benyttet i denne oppgaven. Dette er en automatisert robot som gjør fettfraksjoneringen mer nøyaktig enn hva man kunne ha oppnådd ved manuelt arbeide. Dette var en raskt og tidsbesparende måte for å fraksjonere de ulike lipidklassene, selv om det tidvis oppsto problemer med instrumentet og den har en begrensning på maks ti prøver av gangen. For å måle mengde frie fettsyrer ble gasskromatografi med FID benyttet. Gasskromatografi er en metode som gir mulighet for hurtige analyser, høy oppløsningsevne og deteksjon av selv svært lave konsentrasjoner (Christie, W.W., 1989, Greibrokk, T., *et al.*, 1994). Identifisering av kromatografiske topper er basert på direkte sammenligning mellom toppenes retensjonstider og retensjonstiden til kjente metylestere. Ved hver gasskromatografisk analyse ble 68D benyttet som en ekstern standardblanding, både før, under og etter analysen som en kontroll på retensjonstidene. For hver analyse ble også Orlistat benyttet som en positiv kontroll for å kontrollere at hemmingen av enzymet holdt seg konstant og reproduserbart for hvert forsøk. Noen prøver ble injisert på kolonnen både split 50:1 og splitless, for å bestemme hvilke av metodene som ville være best egnet. Splitless ble benyttet ved videre analyser fordi dette er den beste metoden og benytte til separasjon av frie fettsyrer.

Underveis i oppgaven oppsto det problemer med gasskromatografen som førte til forsinkelser i analysene. Forskjellig feilsøking ble foretatt av ansatte ved Nofima, kolonnen ble skiftet ut og ny standardblanding ble forsøkt analysert. Etter disse problemene måtte alle arealene plottes inn i et Excel ark for hånd, da alle toppene automatisk ble forsvøvet. Dette viste at

## DISKUSJON

metoden har begrensninger når relativt avanserte instrumenter er en del av metoden, og man ikke selv har kompetanse til å utføre feilsøk og reparasjoner.

Selv om både fastfase ekstraksjon og gasskromatografi i seg selv var gode analysemetoder (selv med visse problemer) var dette en svært arbeidsom og tidskrevende metode for å bestemme lipaseaktiviteten. Hvert enkelt analyseoppsett, med maks ti prøver (pga Gerstel MultiPurpose Sampler MPS 2XL Twister sin kapasitet), tok hver to dager, hvor man fikk analyseresultatene en tredje dag. Dette vil derfor være en dårlig egnet metode for screening av mange prøver.

Da modellen var ferdigutviklet og kontrollen med lakseolje fungerte tilfredsstillende, ble modellen benyttet videre for å studere inhibitorisk effekt av ulike plantematerialer og rene plantestoffer.

### 5.2 Inhibitoriske effekter på pankreatisk lipase

Orlistat er kjent som en kommersiell lipaseinhibitor (Dolenc, A *et al.*, 2010, Ballinger, A., 2002). Det var derfor av interesse å starte oppgaven med å undersøke den inhibitoriske aktiviteten Orlistat har på pankreatisk lipase i denne oppgavens modell. Dette var ønskelig for å studere om Orlistat kunne benyttes som positiv kontroll ved analyser. Det ble valgt å benytte en mengde på 1,195 mg, noe som utgjør 1/200 av en hel tablett. Dette var en naturlig mengde i forhold til den simulerte fordøyelsen gjort i denne oppgaven. Mengden utgjør en konsentrasjon på 147,5 µg/mL, og den benyttede konsentrasjonen sammenliknet med andre studier, hhv Slanc, P., *et al.*, 2009 og Gu, Y., *et al.*, 2011, viste seg å være mye høyere. De benyttet seg av hhv 25 µg/mL og 4,9 µg/mL (10 µM). Da konsentrasjonen av Orlistat egentlig ikke var av betydning for oppgaven, men viktigheten med å teste Orlistat var for å bestemme om den kunne benyttes som en positiv kontroll ved videre analyser, ble ikke dette tatt hensyn til. Figur 4.3 viser at 147,5 µg/mL Orlistat reduserte lipaseaktiviteten  $86,9 \pm 6,3$  %. Orlistat viste seg å være en god lipasehemmer, og konsentrasjonen som ble benyttet i alle forsøkene som en positiv kontroll.

Bygg og brokkoli var to plantematerialer som man ønsket å undersøke, ettersom de begge er en del av ”Det Sunne Måltidet”. Det var også av interesse å studere et solbærpressrest-konsentrat, da tidligere studier har vist effektiv inhibering av lipaseaktiviteten med ulike ekstrakter av bær (McDougall, G.J., *et al.*, 2005, 2009). Å tallfeste konsentrasjonen av polyfenoler i et plantemateriale er vanskelig, og man kan oppgi mengder enten som totale fenoler målt med en uspesifikk spektrofotometrisk metode som gallesyre ekvivalenter, eller man kan bestemme konsentrasjonen til utvalgte polyfenoler vha væskechromatografi og kjente standarder. Plantematerialene ble forsøkt tilsatt ved ulike konsentrasjoner, uten at man hadde så mye kunnskap om hvilke konsentrasjoner som faktisk ville kunne vise inhibering av lipaseaktiviteten.

Tidligere studier har vist at bl.a. ulike *Brassica* arter hemmer lipaseaktiviteten (Slanc, P., *et al.*, 2009). Det ble ikke funnet tidligere studier på brokkoli og lipasehemming, så brokkoli, som er en vanlig grønnsak hos forbruker, var derfor av stor interesse å undersøke i denne oppgaven. Brokkoliknoppene inneholder ekstra høyt innhold flavonoler, da flavonol konsentrasjonen er  $\geq 10$  ganger høyere i de grønne knoppene (Manach, C., *et al.*, 2004, Herrmann, K., 1976, Bengtsson, G.B., *et al.*, 2005) enn i stilkene. Brokkoliknopper var også et mer homogent materiale å studere enn om stilkene også inngår i materialet, så derfor ble brokkoliknoppene valgt. Disse ble benyttet både frysetørket og som et ekstrakt.

Mengde frysetørket brokkoliknopper som ble benyttet tilsvarte mengde brokkoli antatt å inntas i løpet av et måltid (jfr. prosjektet ”Det Sunne Måltid”). Frysetørket brokkoliknopper ble tilsatt rett i inkubasjonsblandingen, og forsøket ble ansett som kun delvis vellykket. Det var vanskelig å bedømme hvor godt brokkolimaterialet løste seg opp under fordøyelsen, og man kunne se materialet flyte i løsningen. Resultatene viste at pankreatisk lipase aktivitet ikke ble hemmet, og derfor ble dette forsøket kun gjentatt én gang. Det ble vurdert at en bedre strategi var å ekstrahere ut plantestoffene og inkubere lipasen med et slikt homogent ekstrakt, før eventuelle gjentak med frysetørket brokkoli. Ekstraherte brokkoliknopper viste seg heller ikke å gi noe inhibering av pankreatisk lipase med de benyttede konsentrasjonene. Forsøket ble derfor bare gjentatt én gang, med én parallell ved høyeste konsentrasjon.

Byggryn ble benyttet i studien, da man vet at bygg inneholder fenoliske syrer (Hole, A.S., *et al.*, 2009), som ved tidligere studier har vist inhibering av pankreatisk lipase (Karamac, M., *et al.*, 1996). Det ble først undersøkt mulig hemming med lave byggkonsentrasjoner, men da lipaseaktiviteten ikke ble påvirket, ble det bestemt å teste ut effekten av høyere

## DISKUSJON

konsentrasjoner. Det viste seg at man måtte opp i en konsentrasjon på ~34 mg/mL før man fikk nedsatt lipaseaktivitet sammenliknet med kontrollen. Denne konsentrasjonen vil tilsvare 34 g bygg/L. Da det ved et måltid, som diskutert tidligere, sekreteres ca 0,4 liter galle og bukspytt, vil dette tilsi at ca 20 g byggryn eller mer vil inhibere lipaseaktiviteten.

Solbær er en rik kilde til C-vitaminer og polyfenoler, spesielt antocyaniner, hydroksykaneltsyre og flavonoler (Määttä-Riihinen, K. R., *et al.*, 2004, Karjalainen, R., *et al.*, 2009). Innholdet av totale fenoler i solbærpressrestkonsentratet var ca. 7700 mg GAE/L (gallesyreekvivalenter per liter) (Holtung, L., *et al.*, upublisert). Resultatene av de benyttede konsentrasjonene viser høy inhibering av lipaseaktiviteten, med doserespons (Figur 4.9 og 4.10). Studier utført av McDougall, G.J., *et al.*, 2009, viser inhibering av pankreatisk lipase ved benyttelse av ulike bærekstrakter ved 50 µg GAE/mL. Den studien viser derimot ingen inhibitorisk effekt av solbær. Resultatene fra studiene utført i denne oppgaven viser inhibering med alle de benyttede konsentrasjonene, som en klar doserespons. 237-1901 µg GAE/mL viste seg å inhibere lipaseaktiviteten med 8,1 - 91 %. De to studiene kan likevel ikke sammenlignes da det er benyttet to forskjellige *in vitro* modeller, ulike substrater, mengde substrat og mengde enzym, for å studere lipaseaktiviteten. Forholdet mellom de ulike faktorene må i så fall studeres for at det skal være noen mulighet for sammenligning mellom disse.

Plantematerialer inneholder en rekke ulike plantestoffer. De finnes som oftest som større komplekser, bestående av flere ulike stoffer bundet sammen. Få rene stoffer er å få kjøpt, ettersom markedet for disse er lite. Kun noen få og enkle plantestoffer er rensset opp fra planter, for å kunne benyttes som standarder i ulike metoder. Eksempler på slike rensede plantestoffer er blant andre fenoliske syrer og flavonolet quercetin.

Fenoliske syrer er en gruppe polyfenoler som ofte finnes i planten som glykosylerte derivater eller estere. Disse var av interesse å undersøke da man vet at de er tilstede i byggryn. Studier utført av Hole, A.S., *et al.*, 2009 viser at ca. 2 % av den totale mengden fenoliske syrer i bygg er i fri tilstand; 2,45 µg/g frie og 1411,09 µg/g bundne. Karamac, M., *et al.*, 1996 viser størst inhiberende effekt av pankreatisk lipase med hydroksykaneltsyrene ferulsyre og kaffesyre. Sinapinsyre er den hydroksykaneltsyren som ble vist å ha lavest inhibering av pankreatisk lipase. Sinapinsyre ble allikevel testet, sammen med ferulsyre og kaffesyre i denne oppgaven.

Ved de benyttede konsentrasjonene hadde ikke sinapinsyre noen inhiberende virkning på lipaseaktiviteten, og ble derfor bare analysert én gang. Ferulsyre og kaffesyre viste derimot inhibering av lipaseaktiviteten. Det ble målt høyest inhibering av pankreatisk lipase ved konsentrasjon 5  $\mu\text{M}$ . Lavere og høyere konsentrasjoner ga mindre inhibitorisk effekt. Disse analysene, med konsentrasjonene 5-12,5  $\mu\text{M}$ , ble utført to ganger, med paralleller for hver kjøring, og analysegjentak ga samme resultater. Dette er et motstridende resultat i forhold til tidligere publiserte studier, da det har blitt vist økende inhibering ved økende fenolsyre-konsentrasjoner. Blant andre har Karamac, M., *et al.*, 1996, vist stigende inhibitorisk effekt av alle de fenoliske syrene ved økende konsentrasjoner. En mulig forklaring på analyse-resultatene i denne oppgaven, kan være at ved høye konsentrasjoner av ferulsyre og kaffesyre kan det ha blitt dannet miceller, som umuliggjør binding av de fenoliske syrene, og lipasen får ikke kommet til og hydrolysert triglyseridet. For å bestemme mulig årsak til de avvikende resultatene må videre studier utføres, da mulig årsak kun vil være spekulasjoner.

Flavonolet quercetin var av interesse å studere da dette er det flavonolet som det finnes størst mengder av i brokkoli, som det er mulig å få kjøpt som rent plantestoff. Quercetin ble løst i hhv 100 og 20 % metanol og analyseresultatene viste ingen inhibering av lipaseaktiviteten ved de benyttede konsentrasjonene. Det er heller ikke funnet publikasjoner som viser at quercetin hemmer pankreatisk lipase, men det kan være av interesse å teste ut de mer komplekse flavonolene i brokkoli som består av derivater av quercetin og fenoliske syrer. Men dette er stoffer som ikke er kommersielt tilgjengelige og som evt. må renses opp fra plantematerialer.

På grunn av stadig økende helseproblemer knyttet til fedme og utvikling av metabolsk syndrom, har det blitt et stort fokus på et sunnere kosthold og fysisk aktivitet for å forebygge dette. Ved at fettfordøyelsen hemmes vil man kunne få redusert absorpsjon av fett i tynntarmen, noe som også kan være med å stimulere metthetssignaler og dermed gi økt vektkontroll. Ulike studier har observert inhibering av pankreatisk lipase med forskjellige type plantematerialer. Inntak av cerealier, frukt og grønt kan altså føre til redusert fetthydrolyse og opptak av frie fettsyrer i tarmen. Og polyfenolene kan være med å forebygge ulike sykdommer assosiert med oksidativt stress, som kreft og hjerte- og karsykdommer.

### 5.2.1 Statistiske analyser

Statistiske analyser ble ikke prioritert i denne oppgaven, da hovedmålet med oppgaven kun var å studere om de ulike plantematerialene og rene plantestoffene ville inhibere lipaseaktiviteten eller ikke, og i hvilken grad. Resultatene er derfor kun presentert med enkle standardavvik mellom  $n$  antall kjøringar.

### 5.3 Videre arbeid

Dette studiet har vist varierende inhibering av lipaseaktiviteten med de ulike plantematerialene og rene plantestoffene. På grunn av for lite tid og begrensninger i tilgangen på analyseinstrumenter, ble det ikke muligheter til å kjøre alle forsøkene gjentatte ganger. I videre arbeid vil det derfor være ønskelig å utføre gjentak av en del analyser, og blant annet analysere høyere konsentrasjoner brokkoliknopper. Ved videre arbeid vil det også være av interesse å studere inhiberingseffekten av de ulike plantematerialene og rene plantestoffene i flere ulike *in vitro* modeller, for å se om forskjellige modeller vil gi like resultater. Det vil også være av interesse å gjøre de samme analysene, men med human magesaft som kilde til enzymer og kofaktorer. Flere studier vil være nødvendig for å kartlegge hvilke plantematerialer, og i hvor stor grad, de vil inhibere lipaseaktiviteten, og hvilken betydning dette kan ha for metthetsregulering og utvikling av overvekt og metabolsk syndrom.

Man vet fortsatt lite om de ulike fenoliske komponentene, og hvilke stoffer det er som kan hemme lipasen. Det bør derfor utføres videre studier for å analysere andre plantestoffer og fraksjoner av planteekstrakter. Hvis det dermed påvises inhibering av lipasen ved analyser, vil det være av interesse å karakterisere innholdsstoffene i disse.

Ettersom en metode med fastfase ekstraksjon og gasskromatografi er så tidskrevende ville det være ønskelig å utvikle en enklere *in vitro* analysemetode for å bestemme lipaseaktiviteten med kommersiell pankreatin og galle. Kolorimetrisk lipase assay av typen 'Cobas Lipase colorimetric assay' er en slik enkel analysemetode, som foreløpig egner seg for å måle lipaseaktivitet i human magesaft, men burde kunne utvikles videre for også å kunne benyttes til å måle *in vitro* lipaseaktivitet basert på kommersiell galle og pankreatin.

## 6 Konklusjon

Denne oppgaven viser at kolorimetrisk assay, av typen 'Cobas lipase colorimetric assay' er en dårlig metode for bestemmelse av lipaseaktiviteten, når det skal benyttes kommersiell pankreatin og galle. Derimot viste en modifisert og optimalisert Aura-modell, med fokus på pankreatisk lipaseaktivitet, seg å være en god modell å benytte for å studere ulike plantematerialer og rene plantestoffers inhiberende virkning på lipaseaktiviteten.

Resultatene viser at byggryn og solbærpressrestkonsentrat inhiberer pankreatisk lipase slik at triglyserider ikke hydrolyseres til monoglyserid og frie fettsyrer. Brokkoliknopper viser ingen hemming av lipasen ved de benyttede konsentrasjonene.

Kaffesyre og ferulsyre viser begge inhibering av pankreatisk lipase, men med høyere inhibering ved 5  $\mu\text{M}$  enn ved 12,5  $\mu\text{M}$ . Sinapinsyre og quercetin viser ingen reduksjon i lipaseaktiviteten.

Flere studier vil være nødvendig for å kartlegge hvilke plantematerialer, og i hvor stor grad, de vil inhibere lipaseaktiviteten, og hvilke betydning dette kan ha for metthetsregulering, utvikling av overvekt og metabolsk syndrom.



## 7 Kilder

- Aaby, K., Mazur, S., Nes, A., Skrede, G. (2012). Phenolic compounds in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) fruits: Composition in 27 cultivars and changes during ripening. *Food Chemistry*; 132:86–97
- Aaby, K., Martinsen, B.K., Wrolstad, R.E., Skrede, G. (2006). Polyphenol composition and antioxidant activity in strawberry puree; development during storage. Proc. XXIII International Conference on Polyphenols, 22-25 August 2006, Winnipeg, Canada
- ADAM - Tour the digestive system. Tilgjengelig fra: <http://hepatitis.about.com/od/overview/ig/Organs-of-Digestive-System/Mouth-Anatomy.htm>. Hentet 29.04.2012.
- Adisakwattana, S., Chanathong, B. (2011). Alpha-glucosidase inhibitory activity and lipid-lowering mechanisms of Moringa oleifera leaf extract. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*; **15**: 803-808.
- Aura, A. –M. (2005). In vitro digestion models for dietary phenolic compounds. VTT Publications 575. Espoo. 107 p. + app. 57 p.
- Aura, A. -M., Härkönen, H., Fabritius, M., Poutanen, K. (1999). Development of an in vitro enzymic digestion method for removal of starch and protein and assessment of its performance using rye and wheat breads. *Journal of Cereal Science*; **29**:139-152
- Aura, A. –M., Martin-Lopez, P., O’Leary, K.A.O., Williamson, G., Oksman-Caldentey, M., Poutan, K., Santos-Buelga, C. (2005). In vitro metabolism of anthocyanins by human gut microflora. *European Journal of Nutrition*; **44**:1-10
- Ballinger, A., Peikin, S. R. (2001). Orlistat: its current status as an anti-obesity drug. *European Journal of Pharmacology*; **440**; 109-117.
- Balvoll, G. (1995). *Grønsakdyrking på friland*. 5. utgave, Landbruksforlaget. s. 167-169. Tilgjengelig fra: <http://www.nb.no/utlevering/nb/a4d0bf092d277c1905c389b79351741c>. Hentet 29.04.2012
- Bandyopadhyay, P., Ghosh, A.K, Ghosh, C. (2012). Recent developments on polyphenol-protein interactions: effects on tea and coffee taste, antioxidant properties and the digestive system. *Food Funct.*(Epub ahead of print)

- Bengtsson, G.B., Hagen, S.F., Borge, G.I., Schöner, R., Lombardo, E., Schöner, J., Bilger, W., Berge, A., Haffner, K., Solhaug, K.A. (2007). Effect of postharvest irradiation on health and sensory related properties of apples and broccoli. *Vegetable Crops Research Bulletin*; **65**:153-160.
- Bengtsson, G.B., Schöner, R., Lombardo, L., Schöner, J., Borge, G.I., Bilger, W. (2006). Chlorophyll fluorescence for non-destructive measurement of flavonoids in broccoli. *Postharvest Biology and Technology*; **3**:291-298.
- Boisen, S., Eggum, B. O. (1991). Critical evaluation of *in vitro* methods for estimating digestibility in simple-stomach animals. *Nutrition Research Reviews*; **4**:141-162
- Çam, M., Aaby, K. 2010. Optimization of extraction of apple pomace phenolics with water by response surface methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; **58**:9103-9111
- Christie, W.W. (1989). *Gas Chromatography and lipids: a practical guide*. Oily Press.
- Clifford, M.N. (1999). Klorogensyres and other cinnamates – nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*; **79**:362–372
- Coles, L. T., Moughan, P. J., Darragh, A. J. (2005). *In vitro* digestion and fermentation methods, including gas production techniques, as applied to nutritive evaluation of foods in the hindgut of humans and other simple-stomached animals. *Animal Feed Science and Technology*; **123**:421–444
- Crozier, A., Lean, M. E. J., McDonald, M. S., Black, C. Quantitative analysis of the flavonoid content of commercial tomatoes, onions, lettuce, and celery. *J Agric Food Chem*; **45**:950-995
- Dolenc, Andrej., Govedarica, B., Dreu, R., Kocbek, P., Srčić, S., Kristl, J. (2010). Nanosized particles of Orlistat with enhanced *in vitro* dissolution rate and lipase inhibition. *International Journal of Pharmaceutics*; **369**:149-155
- Dressman, J. B., Vertzoni, M., Goumas, K., Reppas, C. (2007). Estimating drug solubility in the gastrointestinal tract. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **7**:591-602
- Erlanson, C. (1977). Chemical modification of pancreatic lipase. Effect on the colipase-reactivated and the 'true' lipase activity. *FEBS Lett.*; **84**:79-82
- Erlanson-Albertsson, C. (1983). The interaction between pancreatic lipase and colipase: a protein-protein interaction regulated by a lipid. *FEBS Lett.*; **162**:225-229
- Erlanson, C., Barrowman, J., Borgström, B. (1977). Chemical modifications of pancreatic colipase. *Biochim. Biophys. Acta*; **489**:150-162

- Fernández-Martínez, E., Bobadilla, R.A., Morales-Ríos, M.S., Muriel, P., Pérez-Álvarez, V.M. (2007). Trans-3-Phenyl-2-Propenoic Acid (Cinnamic Acid) Derivatives: StructureActivity Relationship as Hepatoprotective Agents. *Medicinal Chemistry*; **3**:475-479
- Gerstel MultiPurpose Sampler Manual. Tilgjengelig fra: <http://www.gerstel.com/en/spe-step-by-step.htm>. Hentet 30.04.2012.
- Gholamhoseinian, A., Shahouzehi, B., Sharifi-far, F. (2010). Inhibitory Effect of Some Plant Extracts on Pancreatic Lipase. *International Journal of Pharmacology*; **6**:18-24
- Gonthier, M.P., Cheynier, V., Donavan, J. L., Manach, C., Morand, C., Mila, I., Lapiere, C., Rémésy, C., Scalbert, A. (2003). Microbial Aromatic Acid Metabolites Formed in the Gut Account for a Major Fraction of the Polyphenols Excreted in Urine of Rats Fed Red Wine Polyphenols. *J. Nutr.*; **133**:461-467
- Greibrokk, T., Lundanes, E., Rasmussen, K. E. (1994). Kromatografi, separasjon og deteksjon. 3.utgave. Universitetsforlaget. s. 109-152, 275-287.
- Grønneberg, T., Hannisdal, M., Pedersen, B., Ringnes, V. *Kjemien stemmer, Kjemi 2*. (2008). 3. utg. Cappelen forlag.
- Gu, Yeyi, Hurst, W.J., Stuart, D. A., Lambert, J.D. (2011). Inhibition of Key Digestive Enzymes by Cocoa Extracts and Procyanidins. *J. Agric. Food Chem.*; **59**:5305-11
- Hadado, T. T., Rau, D., Bitocchi, E., Papa, R. (2009). Genetic diversity of barley (*Hordeum vulgare* L.) landraces from the central highlands of Ethiopia: comparison between the Belg and Meher growing seasons using morphological traits. *Genet Resour Crop Evol*; **56**:1131-1148
- Hagen, S.F., Borge, G.I., Bengtsson, G.B., Bilger, W., Berge, A., Haffner, K., Solhaug, K.A. (2007). Phenolic contents and other health and sensory related properties of apple fruit (*Malus domestica* Borkh., cv. Aroma): Effect of postharvest UV-B irradiation. *Postharvest Biology and Technology*; **45**:1-10
- Herrmann, K. (1976). Flavonols and flavones in food plants: a review. *J Food Technol*; **11**:433-48
- Hole, A.S., Grimmer, S., Natterstad, K., Jensen, M.R., Paur, I., Johansen, S.G., Balstad, T.R., Blomhoff, R., Sahlstrøm, S. (2009). Activation and Inhibition of Nuclear Factor Kappa B Activity by Cereal Extracts: Role of Dietary Phenolic Acids. *J. Agric. Food Chem.*; **57**:9481-9488

- Holtekjølen, A.K., Kinitz, C., Knutsen, S.H. 2006. Flavanol and bound phenolic acid contents in different barley. *J. Agric. Food Chem.*; **54**:2253-2260.
- Holtung, L., Grimmer, S., Aaby, K. (2011). Effect of Processing of Black Currant Press-Residue on Polyphenol Composition and Cell Proliferation. *J. Agric. Food Chem.*; **59**:3632-3640
- Hur, S. J., Lim, B. O., Decker, E. A., McClements, D. J. (2011). *In vitro* human digestion models for food applications. *Food Chemistry*; **125**:1-12
- Karamac, M., Amarowicz, R. (1996). Inhibition of Pancreatic Lipase by Phenolic Acids – Examination *in vitro*. *Z Naturforsch C Biosci*; **51**:90-95
- Karjalainen, R., Anttonen, M., Saviranta, N., Stewart, D., McDougall, G. J., Hilz, H., Mattila, P., Törrönen, R. (2009). A Review on Bioactive Compounds in Black Currants (*Ribes nigrum* L.) and Their Potential Health-Promoting Properties.
- Kusano, R., Andou, H. et al. Fujieda, M., Tanaka, T., Matsuo, Y., Kouno, I. (2008). Polymer-like polyphenols of black tea and their lipase and amylase inhibitory activities. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*; **56**: 266-272.
- Lowe, M.E. (2002). The triglyceride lipases of the pancreas. *J Lipid Res.*; **43**:2007-2016.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*; **79**:727-47.
- Mathews, C.K, van Holde, K.E., Ahern, K.G. (2000). *Biochemistry*. 3th edit. Addison-Wesley Publishing Company. s.629-631
- Määttä-Riihinen, K. R, Kamal-Eldin, A., Mattila, P. H., González-Paramás, A. M., Törrönen, A. R. (2004). Distribution and Contents of Phenolic Compounds in Eighteen Scandinavian Berry Species. *J. Agric. Food Chem.*; **52**:4477–4486
- McClements, D. J., Decker, E. A., Park, Y. (2008). Controlling lipid bioavailability through physicochemical and structural approaches. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*; **49**:48-67
- McClements, D., Li, Y. (2010). Review of *in vitro* digestion models for rapid screening of emulsion-based systems. *Food Funct.*; **1**:32-59
- McDougall, G., Kulkarni, N.N., Stewart, D. (2009). Berry polyphenols inhibit pancreatic lipase activity *in vitro*. *Food Chemistry*; **115**: 193-199
- McDougall, G., Stewart, D. (2005). The inhibitory effects of berry polyphenols on digestive enzymes. *BioFactors*; **23**:189-195

- Moridani, M.Y., Scobie, H., Jamshidzadeh, A., Salehi, P., O'Brien, P. J. (2001). Caffeic acid, chlorogenic acid, and dihydroxycaffeic acid Metabolism: Glutathione Conjugate Formation. *DMD*; **29**:1432-1439
- Olsen, H., Aaby, K., Borge A., G. I. 2009. Characterization and Quantification of Flavonoids and Hydroxycinnamic Acids in Curly Kale (*Brassica oleracea* L. Convar. *acephala* Var. *sabellica*) by HPLC-DAD-ESI-MS<sup>n</sup>. *J. Agric. Food Chem.* **57**:2816–2825
- Onyilagha, J.C., Grotewold, E. (2004). The biology and structural distribution of surface flavonoids. *Recent Res. Devel. Plant Sci.*; **2**:53-71
- Pedersen, J.I., Hjartåker, A., Anderssen S.A. (2009). *Grunnleggende ernæringslære*. 1. utg. Gyldendal akademiske.
- Remberg, S.F., Hagen, S.F., Borge, G.I., Sandberg, E., Jeksrud, W.K. og Haffner, K. (2010). Phenolic Compounds, Antioxidant Activity and other Quality Related Criteria of ‘Summerred’ Apples as Influenced by Postharvest Storage Conditions. *ISHS Acta Horticulturae*, Southeast Asia Symposium on Quality and Safety of Fresh and Fresh-Cut Produce, 2010 Southeast Asia Symposium on Quality and Safety of Fresh and Fresh-Cut Produce, Bangkok, Thailand; **875**:169-176
- Saladin, K. S. (2010) *Anatomy and Physiology*, 5<sup>th</sup> edit., The Unity of Form and Function. New York: McGraw-Hill Companies. s. 973-1004.
- Salter, J., Chaplin, M., Dickerson, J., Davies, J. (1996) "Bile acids and health: is fibre the answer?" *Nutrition & Food Science*; **96**:29 – 33
- Sahlstrøm, S., Hole, A., Naterstad, K., Grimmer, S. Effects of commercial processing of barley on levels of phenolic acids and antioxidant activity: role of dietary phenolic acids on activation and inhibition of nuclear factor kappa b. Finnes i: *Dietary fibre: new frontiers for food and health*. Kamp, J.W., Jones, J., McCleary, B., Topping, D. Wageningen Academic Publishers The Netherlands, pp 514-430
- Scalbert, A., Williamson, G. (2000). Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. *J. Nutr*; **130**:2073—2085
- Shewry, P. R. *Barley: Genetics, Biochemistry, Molecular Biology and Biotechnology*. (1992). Biotechnology in Agriculture No. 5. C.A.B. Intern. s. 3-5.
- Skibola, C.F., Smith, M.T. (2000). Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radic Biol Med.*; **29**:375-83.

- Skrede, G., Martinsen, B. K., Wold, A. B., Birkeland, S. E., Aaby, K. (2012). Variaton in quality parameters between and within 14 Nordic tree fruit and berry species. *Acta Agriculturae Scandinavica*. Section B.
- Slanc, P., Doljak, B., Kreft, S., Lunder, M., Jane, B.S., Ítrukelj, B. (2009). Screening of Selected Food and Medicinal Plant Extracts for Pancreatic Lipase Inhibition. *Phytother. Res.*; **23**, 874–877
- Ulleberg, E.K., Comi, I., Holm, H., Herud, E.B., Jacobsen, M., Vegarud, G.E. (2011). Human Gastrointestinal Juices Intended for Use in *In Vitro* Digestion Models. *Food Dig.*; **2**:52–61
- Von Bothmer, R., van Hintum, T., Knüpfper, H., Sato, K. (2003). *Diversity in Barley (Hordeum vulgare)*. Elsevier Science V. B.
- Witkamp, R. F. (2010) Current and Future Drug Targets in Weight Management. *Pharm Res*; **28**:1792–1818
- Zohary, D., Hopf, M. (2000). *Domestication of Plants in the Old World*. Oxford University Press. s. 64. Tilgjengelig fra:  
[http://books.google.no/books?id=C1H6\\_XWJS\\_gC&pg=PA59&dq=hordeum+vulgare&hl=no&sa=X&ei=8gGgT56hFq354QSI1em9Aw&ved=0CE0Q6AEwBQ#v=onepage&q=hordeum%20vulgare&f=false](http://books.google.no/books?id=C1H6_XWJS_gC&pg=PA59&dq=hordeum+vulgare&hl=no&sa=X&ei=8gGgT56hFq354QSI1em9Aw&ved=0CE0Q6AEwBQ#v=onepage&q=hordeum%20vulgare&f=false). Hentet: 01.05.2012
- Zweigenbaum, J. (2011). *Mass Spectrometry in Food Safety. Methods and Protocols*. 1<sup>st</sup> edit. Humana Press. s. 93-95. Tilgjengelig fra:  
<http://www.springerlink.com/content/w4473717718k7655/#section=902150&page=1&locus=11>. Hentet 29.04.2012